

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie

Vlaminck, Benoît

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des sciences

**Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection
contre l'apoptose apportée par l'hypoxie**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Vlaminck Benoît

Juin 2006

Etude du rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie.

Vlaminck Benoît

Résumé

Majoritairement activé en réponse à une chute de pression partielle en oxygène dans les tissus, le facteur de transcription HIF-1 promeut la survie cellulaire et l'adaptation des cellules aux conditions contraignantes que constitue l'hypoxie. Des cellules peuvent être soumises à une hypoxie dans des situations normales mais également dans des situations pathologiques, comme c'est le cas pour les tumeurs solides. Au sein de celles-ci, l'hypoxie et le facteur HIF-1 qu'elle maintient en permanence activé peuvent engendrer un micro-environnement propice à la malignité. L'hypoxie peut de plus moduler le processus d'apoptose et selon sa sévérité l'induire ou l'inhiber. Il semble qu'au niveau des tumeurs, elle ait plutôt un rôle protecteur rendant ainsi les cellules plus résistantes aux traitements chimiothérapeutiques.

Il a été montré au laboratoire que l'hypoxie pouvait protéger des cellules de la lignée HepG2 contre l'apoptose induite par l'étoposide. Dans le but de concourir à une meilleure compréhension de ces phénomènes, ouvrant peut-être ainsi la voie à des traitements plus efficaces à long terme, nous avons durant ce mémoire investigué le rôle éventuel de HIF-1 dans la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie.

Nous avons procédé en deux étapes. La première consiste en une mise au point d'un système d'inhibition efficace et spécifique de ce facteur. Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches expérimentales : les si-RNA anti HIF-1 α et une molécule appelée échinomycine capable d'empêcher la liaison du facteur HIF-1 à l'ADN. Nous nous sommes rendus compte que bien qu'efficace, l'échinomycine manquait de spécificité et interférait avec divers « pathways » cellulaires. Nous avons donc opté pour les si-RNA, tout aussi efficaces mais beaucoup plus spécifiques.

La seconde étape consistait à étudier l'influence de l'inhibition du facteur HIF-1 par l'utilisation de si-RNA anti HIF-1 α sur des cellules soumises à un stress pro-apoptotique et incubées en hypoxie. Nous avons constaté, par plusieurs approches expérimentales, que lorsque le facteur HIF-1 est incapacité, la protection apportée par l'hypoxie est en partie levée. HIF-1 joue donc un rôle dans cette protection. Nous avons également mis en évidence que HIF-1 régulait de manière négative l'expression du gène pro-apoptotique Bak, ce qui révèle au moins un mécanisme par lequel il pourrait inhiber l'apoptose.

Mémoire de licence en sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur : Carine Michiels

REMERCIEMENTS

Voici le moment de remercier tous ceux qui m'ont aidé et soutenu durant ce mémoire. Tout d'abord, je remercie Mr Remacle ainsi que l'URBC de manière générale pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire et toutes les manipulations intéressantes dans ce labo.

Ensuite, mon promoteur, Carine Michiels pour m'avoir éclairé et guidé ainsi que pour avoir réalisé un grand nombre de corrections en un temps éclair. Merci à Anne, ma copine, pour m'avoir aidé, soutenu et surtout supporté tout au long de mes études.

Je remercie également toute l'équipe HIF, très sympa et sur laquelle on peut toujours compter pour avoir un coup de main. Plus particulièrement, merci à Benjamin (SPh), Lionel, alias Châpo et Choubacc qui se reconnaîtra (vive les surnoms idiots !), qui savent si bien détendre l'atmosphère! Bref, merci à toute la bande de joyeux lurons du bureau. Fred, tu es extrêmement courageuse !

Merci également à Jean-Phi qui m'a si souvent aidé, conseillé et informé durant certaines manip fastidieuses (merci surtout pour sa patience à tout instant, même si je le dérangeais bien souvent !).

Merci à Bleach, Naruto et Hellsing d'exister, bénis soient ces dessins animés qui permettent d'un peu se détendre

Merci enfin aux autres mémorants et à tous les autres chercheurs du labo.

Be

Signification des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AHR	Aromatic Hydrocarbure Receptor
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Akt/PKB	Protéine Kinase B
AML1	Acute Myeloid Leukemia 1
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
AP-1	Activated protein-1
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	ATM and Rad 3 related
BH	Bcl2 Homology domain
bHLH	Basic-Helix-Loop-Helix
BIR	Baculoviral IAP Repeat
BSA	Bovin Serum Albumin
CAD	Caspase Activated-DNAse
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	Cysteiny aspartate-specific protease
CBP	CREB Binding Protein
CO	Monoxyde de carbone
CO₂	Dioxyde de carbone
Ct	Cycle threshold
D.O.	Densité optique
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP Binding protein with Low pI
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
endoG	Endonucléase G

EPO	Erythropoïétine
FADD	Fas-Associated Death Domain protein
Fas-L	Ligand de Fas
FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1
FLIP	Flice like Inhibitory Protein
GAPDH	GlycerAldehyde Phosphate Deshydrogenase
GLUT-1	Glucose Transporter-1
GLUT-3	Glucose Transporter-3
HB	Hypotonic Buffer
HBS	HIF-1 DNA binding site
HDM2	Human Double Minute 2, équivalent du MDM2 murin
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HLH	Helix-Loop-Helix
HRE	Hypoxia Responsive Element
HRP	Horse Radish Peroxidase
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
iCAD	Inhibitor of CAD
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
kDa	kiloDalton
Mcl-1	Myeloid cell lymphome-1
MDR1	Multi Drugs Resistance 1
NBD	Nucleotide Binding Domain
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
Nip-3	Nineteen kDa interacting protein 3
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NO	Monoxyde d' azote
ODD	Oxygen-dependent Degradation Domain
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymérase
PAS	Per ARNT Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldéhyde
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PTP	Permeability Transition Pore
PVDF	PolyVinylidène DiFluoride
pVHL	Protéine von Hippel-Lindau
RdRP	RNA-polymérase-RNA-dépendante

RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA-i	RNA Interferant
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotations par minute
RT	Reverse Transcription
si-RNA	small interferant RNA
Smac	Second mitochondrial activator of caspase
TAD C	Transactivation Domain C-terminal
TAD N	Transactivation Domain N-terminal
TBS	Tris Buffer Saline
t-Bid	truncated Bid
TBP	TATA box Binding Protein
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
TMB	Tétra-Méthyl Benzidine
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TNF-R	Récepteur au TNF
TRADD	TNF-R Associated Death Domain
TRAF-2	TNFR-Associated Factors 2
UTR	Untranslated Region
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

I. Introduction

Avant-propos	12
1. L' hypoxie	14
1. 1. L' apparition de l' oxygène	14
1. 2. L' hypoxie au niveau cellulaire: le facteur de transcription HIF-1	16
1. 2. 1. Structure de HIF	16
1. 2. 2. Structure de ARNT	16
1. 2. 3. Structure de HIF-1 α	16
1. 2. 4. Régulation de l' activité et activation de HIF-1	18
1. 2. 5. Autres moyens d' activation	20
1. 2. 6. Métabolisme du glucose	20
1. 2. 7. Amélioration du potentiel d' oxygénation de l' organisme	22
1. 2. 8. La survie et prolifération cellulaire	22
1. 3. HIF et le cancer	23
1. 3. 1. L' augmentation de la glycolyse	23
1. 3. 2. La néoangiogenèse tumorale	25
1. 3. 3. Autres	25
2. L' apoptose	25
2. 1. Caractéristiques de cellules en apoptose et comparaison avec la nécrose	27
2. 2. Les caspases et leur activation	27
2. 3. Le rôle de la mitochondrie	28
2. 4. Les protéines de la famille Bcl-2	31
2. 4. 1. Les protéines anti-apoptotiques	31
2. 4. 2. Les protéines pro-apoptotiques	31
2. 5. L' apoptosome et l' activation de la procaspase 9	33
2. 6. L' apoptose: la voie intrinsèque, dommages à l' ADN	33
2. 7. La voie extrinsèque	35
2. 7. 1. La voie FAS	35
2. 7. 2. La voie du TNF	37
2. 8. L' absence de signaux de survie	37
2. 9. L' apoptose et le cancer	37
2. 10. L' hypoxie et l' apoptose interactions	38
3. Objectifs	39

II. Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire	42
1. 1. Les types cellulaires utilisés	42
1. 2. Le repiquage des cellules HepG2	42
1. 2. 1. Matériel	42
1. 2. 2. Méthode	42
1. 3. Le repiquage de HeLa	42
2. Incubation sous hypoxie	44
2. 1. Matériel	44
2. 2. Méthode	44

3. Marquage en immunofluorescence	44
3. 1. Principe	44
3. 2. Matériel	44
3. 3. Méthode	45
3. 3. 1. Repiquage en plaque multipuits	45
3. 3. 2. Marquage	45
4. Western blot	48
4. 1. Principe	48
4. 2. Extraits protéiques totaux	48
4. 2. 1. Matériel	48
4. 2. 2. Méthode	48
4. 3. Préparation des échantillons	48
4. 4. Electrophorèse	48
4. 4. 1. Matériel	48
4. 4. 2. Méthode	50
4. 5. Transfert (Blotting)	50
4. 5. 1. Matériel	50
4. 5. 2. Méthode	50
4. 6. Saturation et révélation	50
4. 6. 1. Matériel	50
4. 6. 2. Méthode	50
5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	52
6. Mesure de la liaison à l' ADN (TransAM)	52
6. 1. Principe	52
6. 2. Matériel	52
6. 2. 1. L' extraction nucléaire	52
6. 2. 2. Le dosage colorimétrique	54
6. 3. Méthode	54
6. 3. 1. L' extraction nucléaire	54
6. 3. 2. Le dosage colorimétrique	54
7. Transfection avec des si-RNA	56
7. 1. Matériel	56
7. 2. Méthode	56
8. Système rapporteur	56
8. 1. Principe	56
8. 2. Matériel	56
8. 3. Méthode	56
9. L' extraction d' ARN total	58
9. 1. Matériel	58
9. 2. Méthode	58
10. La PCR en temps réel	59
10. 1. Principe	59
10. 2. La rétro-transcription	59
10. 2. 1. Matériel	59
10. 2. 2. Méthode	59
10. 3. PCR en temps réel	61
10. 3. 1. Matériel	61
10. 3. 2. Méthode	61
11. L' apoptochip	61
11. 1. Principe	61

11. 2. La rétro-transcription	61
11. 2. 1. Matériel	61
11. 2. 2. Méthode	63
11. 3. Hybridation	63
11. 3. 1. Matériel	63
11. 3. 2. Méthode	63
12. Dosage de l' activité caspase 3.....	63
12. 1. Principe	63
12. 2. Matériel	63
12. 3. Méthode	65

III. Résultats et Discussion

1. Première approche : inhibition de HIF-1 par l' échinomycine.....	67
1. 1. Efficacité de l' échinomycine	67
1. 1. 1. Efficacité de l' échinomycine à inhiber la liaison de HIF1 à l' ADN in-vitro	69
Description de l' expérience	69
Analyse des résultats	69
1. 1. 2. Efficacité de l' échinomycine sur l' activité de HIF1 in-vivo	71
1.1.2.1. Mesure de l' activité de HIF1 par système rapporteur	71
Description de l' expérience	71
Analyse des résultats	71
1.1.2.2. Mesure de l' expression de deux gènes cible de HIF1	71
Description de l' expérience	71
Analyse des résultats	74
1. 1. 3. Effet de l' échinomycine en normoxie	74
1.1.3.1 Effet de l' échinomycine sur l' abondance protéique de HIF1 α	74
Description de l' expérience	74
Analyse des résultats	74
1.1.3.2. Effet de l' échinomycine sur l' abondance et la localisation sub-cellulaire de HIF-1 α	78
Description de l' expérience	78
Analyse des résultats	78
1.1.3.3. Effet de l' échinomycine sur l' abondance de l' ARN messager de HIF-1 α	78
Description de l' expérience	78
Analyse des résultats	78
1.1.3.4. Conclusions	79
1. 2. Spécificité de l' échinomycine	81
1. 2. 1. Activité de liaison à l' ADN des facteurs c-myc et AP-1 en présence d' échinomycine	81
1.2.1.1. Activité de liaison à l' ADN de c-myc	81
Analyse des résultats	81
1.2.1.2. Activité de liaison à l' ADN de AP1	81
Analyse des résultats	81
1. 2. 2. Activité transcriptionnelle des facteurs c-myc et AP-1 en présence d' échinomycine	83
1.2.2.1. Le système rapporteur c-myc : description de l' expérience	83
Analyse des résultats	83

1. 2. 2. 2. Le système rapporteur AP-1	83
Analyse des résultats	85
1. 3. Conclusions	85
2. Seconde approche : inhibition de HIF-1 par les si-RNA anti HIF-1α	87
2. 1. Introduction	87
2. 1. 1. Bref rappel du principe de fonctionnement des si-RNA	87
2. 1. 2. Les si-RNA provenant de chez Dharmacon	88
2. 2. Etude de l'efficacité de silencing des siRNA anti HIF-1 α	88
2. 2. 1. Effet de différentes concentrations en si-RNA anti HIF-1 α sur l'abondance de la protéine visualisée en immunofluorescence	91
Description de l'expérience	91
Analyse des résultats	91
2. 2. 2. Effet de différentes concentrations en si-RNA anti HIF-1 α sur l'abondance de la protéine visualisée par western blot	93
Description de l'expérience	93
Analyse des résultats	93
2. 2. 3. Effet des si-RNA anti HIF-1 α sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1	93
Description de l'expérience	95
Analyse des résultats	95
3. Etude de l'implication du facteur de transcription HIF1 dans la protection contre l'apoptose en hypoxie	96
3. 1. Etude de l'apoptose	96
3. 1. 1. Suivi du clivage de PARP	96
Description de l'expérience	99
Analyse des résultats	99
3. 1. 2. Mesure de l'activité de la caspase 3	99
Description de l'expérience	101
Analyse des résultats	101
3. 2. Approche transcriptomique	102
3. 2. 1. L'apoptochip	102
Description de l'expérience	102
Analyse des résultats	102
Gènes induits par l'hypoxie	102
Gènes induits par l'étoposide	104
3. 2. 2. Confirmation des résultats par real time PCR	104
3. 3. Conclusion	104

IV. Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives	108
----------------------------	-----

V. Bibliographie

Bibliographie	113
---------------	-----

VI. Annexes

Introduction

Avant-propos

Véritable fléau des temps modernes et apanage des pays occidentaux, le cancer est une maladie de plus en plus fréquente et devient une cause de décès courante. En effet, selon les statistiques, une personne sur trois sera dans sa vie affectée à un quelconque degré par cette maladie. Notre mode de vie engendrant beaucoup de stress, une alimentation déséquilibrée et une pollution environnementale croissante y sont très certainement pour beaucoup. Mais un autre facteur entrant en compte et étant très peu souvent cité est l'accroissement de notre durée de vie, notamment grâce à l'amélioration de la médecine et des soins de santé. Un organisme subit au cours de sa vie toute une série de stress et de perturbations entraînant des dommages et altérations irréparables s'accumulant alors que la vie se poursuit. Ces dommages sont par exemple des altérations induites à l'ADN par des rayonnements, des molécules toxiques endogènes, tels les ROS (Reactive Oxygen Species), des molécules toxiques exogènes ou d'autres facteurs encore. Parfois ces mutations peuvent être bénignes mais il se peut qu'en s'accumulant, elles modifient ou suppriment la fonction de certains gènes. Si ces modifications et/ou suppressions de fonctions touchent des oncogènes, elles peuvent induire la transformation de la cellule atteinte et provoquer un cancer. Un organisme plus vieux aura donc pu accumuler plus d'altérations et a donc une probabilité plus grande d'être atteint.

Mais qu'est le cancer au juste? On peut considérer qu'un cancer est une maladie qui apparaît à partir d'une cellule ayant subi suffisamment de mutations pour que son processus de division ne soit plus bien contrôlé. Une cellule cancéreuse éprouve également souvent beaucoup de difficultés à déclencher son processus de mort cellulaire programmée : l'apoptose. Celle-ci est censée être mise en marche lorsqu'une cellule est agressée ou endommagée par des stress divers de telle sorte qu'elle soit éliminée avant de devenir dangereuse pour l'intégrité de l'organisme auquel elle appartient. Cette cellule incapable de se suicider et dont la division échappe à tout contrôle prolifère et finit par générer un « organe » à part entière (pour les tumeurs solides). Au fur et mesure que cette tumeur grossit, son centre s'éloigne des capillaires sanguins et se trouve de moins en moins approvisionné en oxygène. Il devient hypoxique. Cette hypoxie va entre autres induire l'activation d'un facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). Ce facteur est important car en plus de jouer un rôle dans l'adaptation des tissus néoplasiques à l'hypoxie, il diminue la sensibilité de ceux-ci aux agents anti-tumoraux. Il peut en plus favoriser la dispersion de cellules malignes dans l'organisme en engendrant la vascularisation de la tumeur. HIF-1 est donc une cible potentielle et de plus en plus étudiée pour le traitement anti-tumoral. Nous avons montré à l'URBC que, en plus des rôles qu'on lui connaissait, l'hypoxie pouvait induire chez certains types cellulaires une protection par rapport à l'apoptose. Cette protection implique-t-elle HIF-1 ou en est-elle complètement indépendante? Les recherches continuent, et c'est dans ce cadre que se situe ce mémoire. Beaucoup de choses restent à apprendre sur HIF-1, sur son influence dans le processus d'apoptose et sur son rôle dans la survie des cellules tumorales.

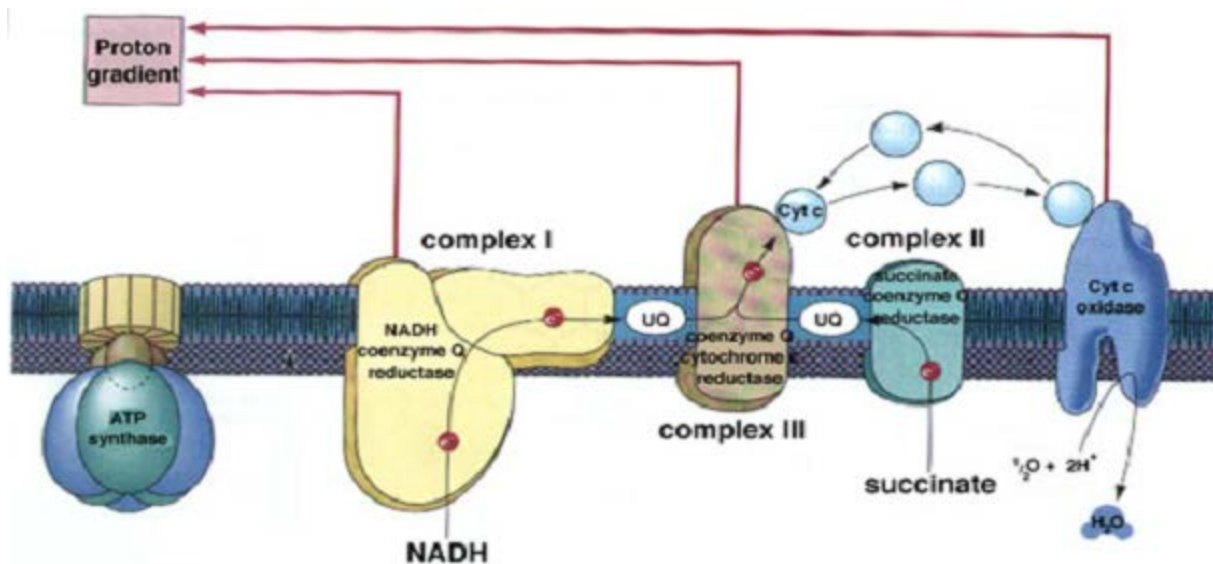


Figure 1.1. La chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale interne.

Les électrons cheminant le long de cette chaîne de transport perdent petit à petit leur énergie qui est utilisée pour pomper des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de concentration. Celui-ci actionne le complexe multiprotéique ATP synthase qui peut convertir l'énergie que perdent les protons en retournant dans la matrice en liaison hautement énergétique dans la molécule d'ATP. En bout de chaîne, l'oxygène accepte les électrons « vidés » de leur énergie.

(<http://florey.biosci.uq.edu.au/GMC/etchain.jpg>)

1. L' hypoxie

1.1. L' apparition de l' oxygène

L'intense activité des algues bleues pendant plusieurs centaines de millions d' années ainsi que la photolyse de l' eau en haute atmosphère ont permis l' accumulation de l' oxygène et par de là, de l' ozone dans l' atmosphère terrestre. L' atmosphère hostile qui ~~ait~~ régné jusque là, dépourvue de couche protectrice, permettait à toute une série de longueurs d' onde nocives de toucher le sol, rendant de la sorte la vie extra-aquatique difficile. La vie ayant jusqu' alors existé était limitée aux procaryotes aquatiques et comptait surtout des formes photo- et chémo-autotrophes. L' apparition de l' oxygène et de l' ozone en découlant fut probablement le déclic qui a donné à la vie l' opportunité de sortir de l' eau et de se diversifier dans plusieurs directions. L' oxygène, en plus de pourvoir à la formation de la couche protectrice nous protégeant des radiations solaires les plus nocives, sert chez un grand nombre de formes de vie d' accepteur final d' électrons dans la respiration. Alors que certains organismes produisent leur ATP, principale source cellulaire d' énergie, en utilisant l' énergie de la lumière, d' autres utilisent l' oxydation de composés minéraux ou organiques. La production d' ATP chez toutes les espèces vivantes a pour point commun la formation d' une force proton motrice capable d' actionner des complexes multiprotéiques appelés ATP synthases (*Figure 1.1.*). Ceux-ci sont à même de reformer la liaison à haut potentiel énergétique de l' ATP à partir d' ADP et de phosphate inorganique. Chez les espèces vivantes utilisant des molécules organiques comme combustible et l' oxygène comme comburant, la génération de la force proton motrice se fait par « arrachage » d' électrons énergétiques à des molécules réduites (glucose, acides gras, acides aminés...). Ces électrons transitent en suite le long d' une chaîne de transporteurs qui, chez les procaryotes, se situe dans des replis de la membrane cellulaire et, chez les eucaryotes, au sein de la membrane mitochondriale interne. Au fur et à mesure de leur transit le long de cette chaîne, les électrons perdent leur énergie qui est utilisée pour créer un gradient de concentration de protons. En bout de course les électrons sont cédés à une poubelle, un accepteur final, l' oxygène moléculaire (dioxygène). L' utilisation de l' oxygène comme accepteur final est rentable et intéressante. L' oxygène s' étant accumulé dans l' atmosphère au départ en tant que déchet métabolique d' espèces photosynthétiques a maintenant une fonction importante et est devenu indispensable pour les organismes qui l' utilisent.

Comme beaucoup d' animaux, l' homme présente une dépendance totale vis-à-vis de l' oxygène. Son importance est capitale pour le bon fonctionnement des cellules et de l' organisme. Il est nécessaire à une production énergétique permettant aux cellules d' effectuer des tâches nécessaires à leur survie. Bien qu' il puisse, lorsque présent en quantité trop importante, être nocif (génération d' espèces hautement réactives), l' oxygène est indispensable et une trop faible concentration est également préjudiciable. L' homéostasie de l' oxygène doit donc être finement régulée sous peine de lourds dommages.

Toutes les espèces multicellulaires utilisant l' oxygène ont élaboré des mécanismes complexes pour pouvoir desservir de manière constante les moindres parties de leur organisme en cette molécule. Aussi, sont-elles équipées d' un système de captage performant et d' un système circulatoire ramifié dont la longueur totale chez l' homme est de l' ordre de 100000 km. Chez les mammifères, un manque d' oxygène ou « hypoxie » au niveau de l' organisme sera perçu par différents systèmes senseurs tels les corps carotidiens qui agiront de concert afin de moduler la ventilation pulmonaire, le rythme cardiaque, ainsi que la circulation sanguine pour rétablir l' équilibre (Michiels, 2004). Au niveau cellulaire, l' hypoxie va principalement

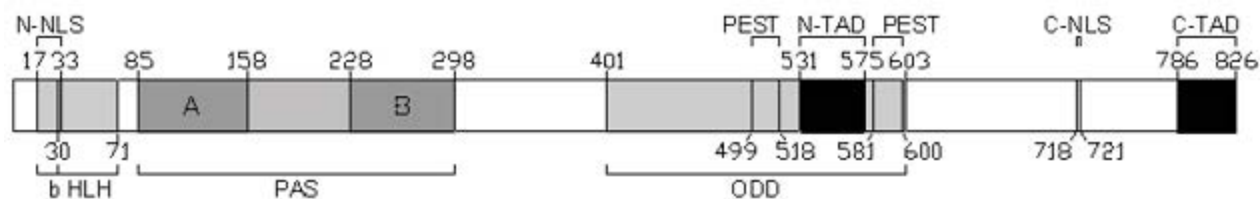


Figure 1.2. Structure détaillée de HIF-1 α .

La protéine HIF-1 α comprend un domaine bHLH (AA 17 à 71), deux domaines PAS (aa 85 à 298) impliqués dans la dimérisation, le domaine ODDD (aa 401 à 603) responsable de la dégradation de HIF-1 α en normoxie, ainsi que deux TAD dont le N-TAD est superposé au domaine ODDD (aa 531 à 575 pour N-TAD, et aa 786 à 826 pour le C-TAD) (Zagorska et Dulak, 2004).

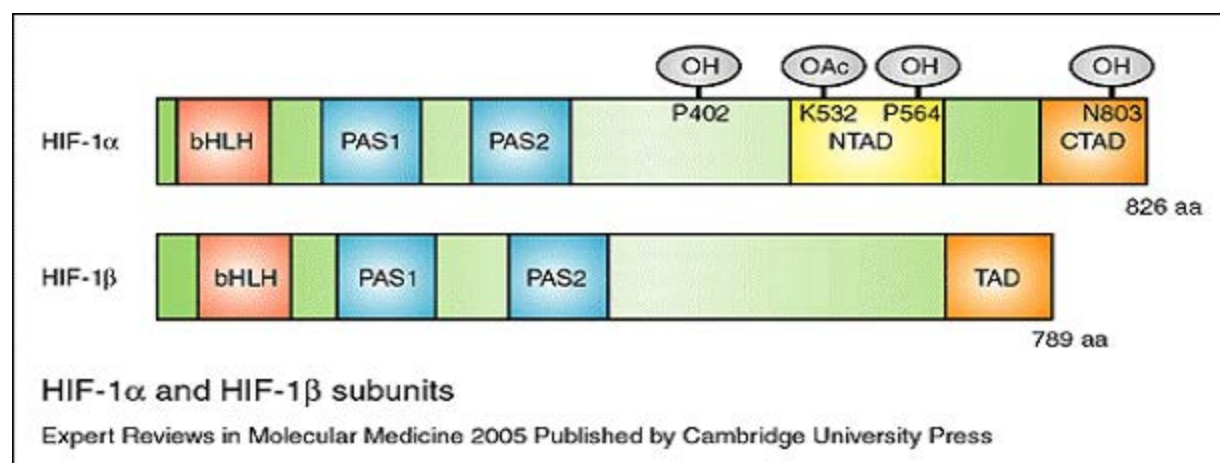


Figure 1.3. Structure de HIF-1 α et de ARNT, modifications incapacitantes de HIF-1 et HIF-1 α

Structure de HIF-1 α en parallèle avec celle de HIF-1 β (ARNT)

Les différentes modifications apportées au sein du domaine ODDD (non délimité sur cette représentation) responsables de la dégradation de HIF-1 α en normoxie sont l'hydroxylation des prolines 402 et 564 par les PHD et l'acétylation de la lysine 532 par ARD1. Une seconde modification incapacitant le facteur en normoxie, mais agissant cette fois-ci sur l'activité transcriptionnelle du facteur complet, est l'hydroxylation de l'asparagine 803 par FIH (www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig002mas.gif).

déclencher deux choses. La première consiste en une hiérarchisation de l' utilisation de l' énergie. Il s' agit de limiter les mécanismes coûteux en ATP et non indispensables tels que la synthèse protéique et la synthèse d' ADN pour privilégier le fonctionnement des pompes ioniques sans lesquelles la cellule mourrait rapidement. La seconde est l' activation d' un facteur de transcription permettant une adaptation à plus long terme à ces conditions : il s' agit du facteur HIF-1.

1.2. L' hypoxie au niveau cellulaire : le facteur de transcription HIF-1

1.2.1. Structure de HIF

Principal acteur de la réponse cellulaire à l' hypoxie, le facteur de transcription HIF1 est constitué de deux sous-unités comportant les motifs bHLH et PAS : HIF-1 α et HIF-1 β ou ARNT (*Figures 1.2. et 1.3.*). Il existe également des sous-unités HIF-2 α et HIF-3 α pouvant s' associer avec ARNT. Il semble que HIF-2 α agisse de la même manière que HIF-1 α , par contre, sa localisation est plus restreinte et est spécifique de certains tissus. D' autre part, HIF-3 α semble agir en tant qu' inhibiteur du facteur HIF car il ne possède pas de domaine de transactivation. Les deux sous-unités HIF-1 α et ARNT partagent deux domaines, le domaine bHLH et le domaine PAS. Ces deux domaines sont impliqués dans la dimérisation du facteur ainsi que dans la reconnaissance de l' ADN. Le domaine basique ainsi que la partie C terminale de PAS sont plutôt requis pour la liaison à l' ADN, alors que la partie HLH et l' extrémité N terminale de PAS sont plutôt impliqués dans la dimérisation (Höpfl *et al.*, 2004). Lorsque le facteur HIF-1 est formé, il peut se fixer au niveau de séquences appelées HRE (Hypoxia Response Element) contenant entre autres un HBS (HIF Binding Site). Ce HBS contient une séquence, CGTG appelée E-box faisant partie de la séquence reconnue par tous les facteurs à motif bHLH (comme c-myc et Myo D).

1.2.2. Structure de ARNT

ARNT (Aryl Receptor Nuclear Translocator) est exprimé constitutivement et se localise au niveau du noyau (Chilov *et al.*, 1999). Il fut nommé de la sorte car d' abord identifié en temps que partenaire de AHR (Aromatic Hydrocarbure Receptor) avec lequel il forme un facteur de transcription capable d' induire l' expression du cytochrome p450 en réponse à la présence d' hydrocarbures. Il comporte principalement un domaine bHLH et un domaine PAS. ARNT existe sous deux isoformes issues d' un épissage alternatif, comportant respectivement 774 et 789 résidus (Wang *et al.*, 1995).

1.2.3. Structure de HIF-1 α

HIF-1 α est la pièce maîtresse du facteur HIF-1, car c' est par celle-ci que va s' opérer en majeure partie la régulation de l' activité transcriptionnelle de ce dernier. C' est une protéine de 826 acides aminés qui possède de son côté N terminal le domaine bHLH (aa 17 à 71) ainsi que le domaine PAS (aa 85 à 298) - (*Figure 1.2.*). HIF-1 α est doté de deux motifs NLS lui permettant de se localiser dans le noyau, et ce indépendamment de son partenaire ARNT (Kallio *et al.*, 1998). Des résidus 401 à 603, se trouve un domaine particulier impliqué dans la régulation de la dégradation de HIF-1 α , c' est le domaine ODD (Oxygen-Dependent Degradation Domain). Enfin, cette sous-unité comporte deux domaines de transactivation : TAD C et TAD N (domaine de transactivation C-terminal et N-terminal), ce dernier se superposant au domaine ODD. Cette sous-unité est exprimée de manière constitutive, mais

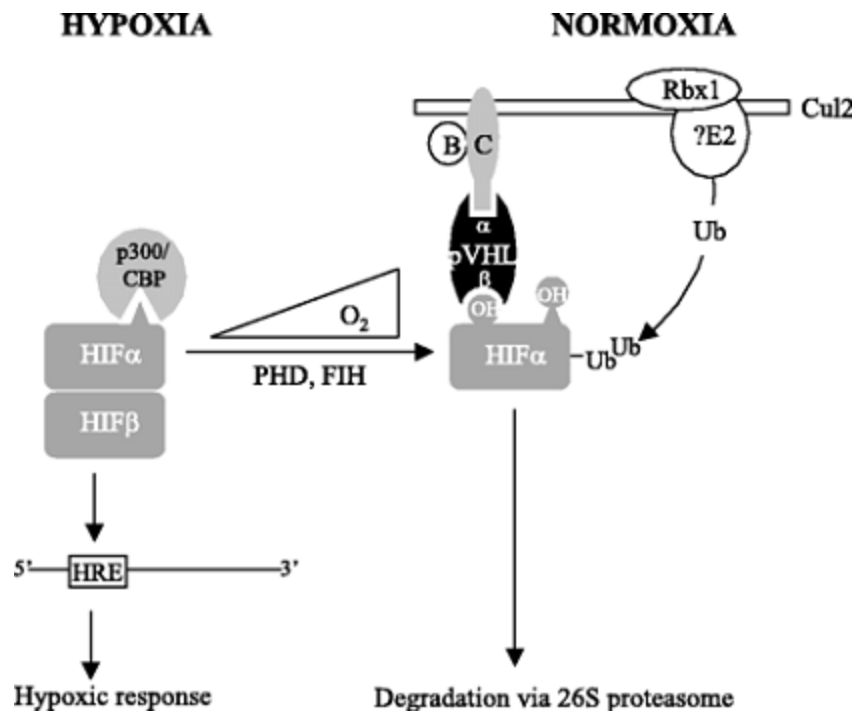


Figure 1.4. Modifications de HIF-1 et de HIF-1 α en fonction de la teneur en O_2 et rôle du complexe ubiquitine ligase.

En présence d'oxygène HIF-1 α est hydroxylé et acétylé en son domaine ODDD et le facteur HIF-1 complet voit son activité limitée par une hydroxylation dans son domaine de transactivation. Les différentes modifications apportées au sein du domaine ODDD ciblent HIF-1 α vers sa dégradation en recrutant un complexe ubiquitine ligase. Les différents acteurs impliqués dans la formation du complexe E3 complet sont pVHL, reconnaissant HIF-1 α par le biais de ses prolines hydroxylées et de sa lysine acétylée, les élongines B et C, la culline 2 et Rbx1. Lorsque l'oxygène se raréfie, HIF-1 α n'est plus modifié, il n'est donc plus reconnu par pVHL et le facteur complet et transcriptionnellement actif qui est formé, peut reconnaître sa séquence de liaison HRE, et via le coactivateur p300, déclencher la transcription des gènes permettant à la cellule de s'adapter au stress de l'hypoxie (Sufan *et al.*, 2004).

possède une demi-vie extrêmement limitée en normoxie ; en effet celle-ci est inférieure à 10 minutes en présence d'oxygène (Chunet *al.*, 2002).

1.2.4. Régulation de l'activité et activation de HIF1

La régulation de l'activité de HIF-1 se déroule à plusieurs niveaux : la stabilité de la sous-unité HIF-1 α , la quantité de HIF-1 disponible, et enfin l'activité transcriptionnelle de HIF1.

En normoxie, HIF-1 est peu ou pas actif car le dimère transcriptionnellement fonctionnel ne peut se former. En effet, bien que constitutivement transcrite et exprimée, la sous-unité HIF-1 α est très rapidement dégradée. Cette dégradation est due à l'hydroxylation en son domaine ODD de deux résidus proline (402 et 564) (*Figure 1.2.*). Celle-ci est réalisée par des enzymes appartenant à la superfamille des dioxygénases : les prolyl-hydroxylases ou PHD (Bruick and McKnight, 2001). Quatre sont à l'heure actuelle connues: PHD1-2-3, ainsi qu'une quatrième plus récemment décrite. Ces enzymes réalisent l'hydroxylation des prolines à partir d'oxygène et de 2-oxoglutarate en présence d'ascorbate et d'atomes de fer. Lorsque l'oxygène ou le 2-oxoglutarate sont limitants, ou encore que le fer est chélaté ou remplacé par du cobalt, elles sont inhibées. Une fois HIF-1 α hydroxylé, il pourra être reconnu par un complexe d'ubiquitination qui va le destiner à sa dégradation par le protéasome 26S (Kallio *et al.*, 1999). Un des acteurs les plus importants dans l'ubiquitination de HIF1 est la protéine de von Hippel-Lindau : pVHL. L'inactivation de celle-ci est associée à des tumeurs héréditaires caractérisées par une extrême vascularisation. PVHL est en fait la composante de la machinerie chargée de la reconnaissance du substrat. PVHL interagit avec le domaine ODD de HIF-1 α lorsque celui-ci est hydroxylé. Il peut alors recruter l'élongine B, l'élongine C, la culline 2, et enfin Rbx1 I pour former un complexe E3 complet et fonctionnel (Semenza, 2001) (*Figure 1.4.*). Ce complexe peut alors polyubiquitiner HIF-1 α qui sera ainsi rapidement dégradé. Une acétylation au sein du domaine ODD catalysée par l'acétyltransférase ARD sur la lysine 532 renforce également l'affinité de pVHL pour HIF-1 α . L'activité de cette acétylase diminue en hypoxie. En hypoxie, l'O vient à manquer et les prolyl hydroxylases ne sont plus en mesure d'hydroxyler l'entièreté du pool de HIF1 α qui s'accumule et peut alors migrer dans le noyau et y dimériser avec ARNT pour former le facteur complet.

Cependant, la formation du facteur complet suite à la stabilisation de HIF-1 α à elle seule n'est pas suffisante pour en induire pleinement l'activité. En plus d'être présent, ce facteur doit être transcriptionnellement actif. Pour ce faire, il doit pouvoir contacter, via l'intermédiaire de CBP/p300, la machinerie de transcription, mais aussi des protéines telles que les histones acétylases permettant un remodelage de la chromatine favorable à la transcription. HIF-1 entre en contact avec le co-activateur via ses deux domaines de transactivation N-TAD et C-TAD. Ces deux zones de HIF-1 interagissent avec des régions de p300 riches en cystéines et histidines, les domaines CH1 et CH3 (Freedman *et al.*, 2002). L'interaction se fait davantage par C-TAD que N-TAD, cependant la synergie des deux résulte en une bien meilleure transactivation que lorsque C-TAD intervient seul. Le co-activateur recruté peut alors induire le recrutement du complexe de transcription tout en favorisant « l'ouverture » de la chromatine par acétylation des histones. Cette acétylation a lieu d'une part par l'activité intrinsèque de CBP/p300, d'autre part via le recrutement par celui-ci d'acétyltransférases comme SRC-1, TIF-2, et Ref-1 (Zagorska and Dulak, 2004). En normoxie, l'asparagine 803 du C-TAD est hydroxylée par une asparaginyl hydroxylase appelée FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) dont l'activité dépend, comme pour les PHD, de l'oxygène. Cette hydroxylation provoque un encombrement stérique limitant l'interaction entre HIF-1 et ses partenaires. De ce fait, même si HIF est stabilisé en normoxie, par exemple par inhibition des prolyl-

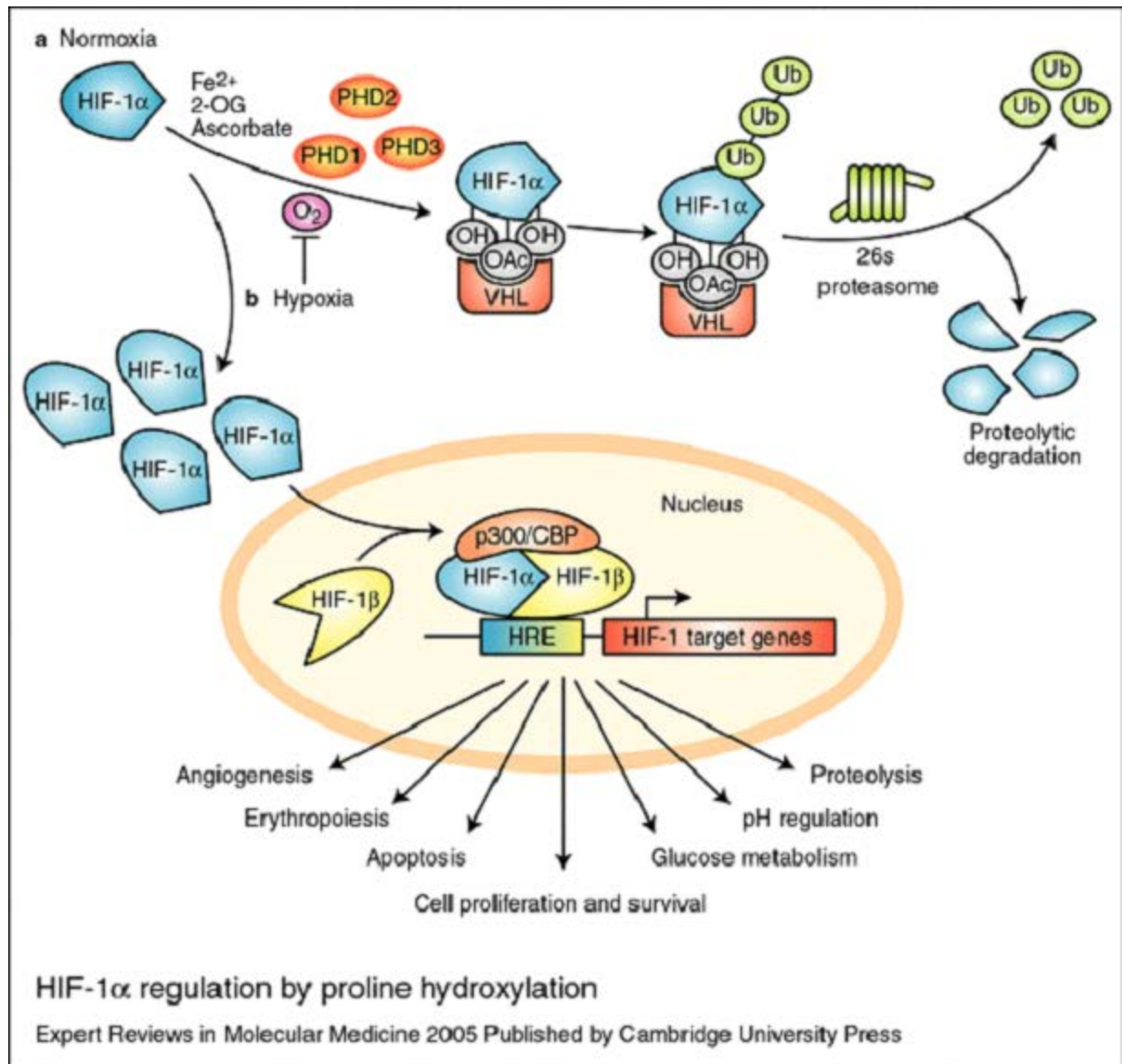


Figure 1.5. Schéma récapitulatif de la régulation de HIF-1 et des effets au niveau cellulaire. (www-ermm.cbcu.cam.ac.uk).

hydroxylases au chlorure de cobalt, il ne sera que peu actif. Les deux systèmes d'hydroxylation incapacitant le facteur en normoxie peuvent être considérés comme des senseurs à l'oxygène. Ces senseurs faisant en sorte que le facteur n'est activé que quand cela est nécessaire, c'est-à-dire en hypoxie.

1.2.5. Autres moyens d'activation

Il existe d'autres voies d'activation de HIF1 indépendantes de la concentration en oxygène. HIF-1 se voit par exemple activé par l'activation des récepteurs à tyrosine kinase aux facteurs de croissance. Cependant, ces activations ne passent pas par la stabilisation de HIF-1 α . Elles se font d'une part via une augmentation de la synthèse protéique de HIF-1 α menant à saturation le système d'incapacitation dépendant de l'O₂, et d'autre part via des phosphorylations par ERK 1 et 2, augmentant sa capacité transcriptionnelle.

L'activation de HIF1 va permettre d'induire la transcription de gènes permettant à la cellule et l'organisme de mieux faire face aux conditions contraignantes que représente l'hypoxie (*Figure 1.5.*). Ces gènes sont très variés, et une soixantaine d'entre eux ont été identifiés à l'heure actuelle (Lee *et al.*, 2003).

1.2.6. Métabolisme du glucose.

Pour continuer d'assurer une production d'ATP suffisante à sa survie en absence d'oxygène, la cellule va considérablement activer son métabolisme glycolytique. En temps normal, nos cellules produisent la majeure partie de leur énergie par phosphorylation oxydative. Ce mécanisme rentable (36 moles d'ATP par mole de glucose) ne peut continuer à fonctionner pleinement en hypoxie et est alors complété par un mécanisme compensatoire de production de l'ATP indépendant de l'O₂. Ce mécanisme est la phosphorylation au niveau du substrat et se déroule pendant la glycolyse. Il ne produit que 2 moles d'ATP par mole de glucose. La glycolyse est suractivée en hypoxie de manière dépendante de HIF-1 et ceci par une augmentation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse elle-même, mais aussi par la sur-expression de transporteurs de glucose à haute affinité et d'enzymes régulatrices de la glycolyse. Les transporteurs sont les transporteurs GLUT1 et GLUT3 (Gleadle and Ratcliffe, 1997, O'Rourke *et al.*, 1996). Les enzymes de la glycolyse se voient pratiquement toutes surexprimées (Höpfl *et al.*, 2004). En plus de cela, une enzyme responsable de la synthèse d'un régulateur allostérique extrêmement puissant de la phosphofructokinase (le fructose 2,6-biphosphate) est également surexprimée : la PFKFB3. La phosphofructokinase est une enzyme cruciale de la glycolyse puisque qu'elle en régle la cinétique. La PFKFB3 est une enzyme bi-fonctionnelle étant, selon les conditions, 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-biphosphatase (Minchenko *et al.*, 2005). La balance kinase/phosphatase est régulée allostériquement par l'AMP et l'ATP. L'AMP active la kinase et l'ATP la phosphatase. L'induction de la glycolyse n'a pas pour seule conséquence le maintien d'une production d'ATP, elle comporte aussi des avantages pour la prolifération cellulaire. En effet, plusieurs intermédiaires de la glycolyse sont également des précurseurs de certains acides aminés tels la glycine et la lysine mais aussi de pyrimidines/purines. La glycolyse va aussi augmenter l'acidité des tissus car elle produit des acides organiques tel l'acide lactique. Ces derniers semblent favoriser l'accumulation de HIF-1 α et donc en partie l'activité de HIF1 indépendamment de la concentration en O₂ (Lu *et al.*, 2002). Cela explique en partie le fait que les cellules tumorales ont un haut métabolisme glycolytique même en normoxie. Ce phénomène est connu depuis longtemps sous le nom d'effet Warburg. HIF1 et

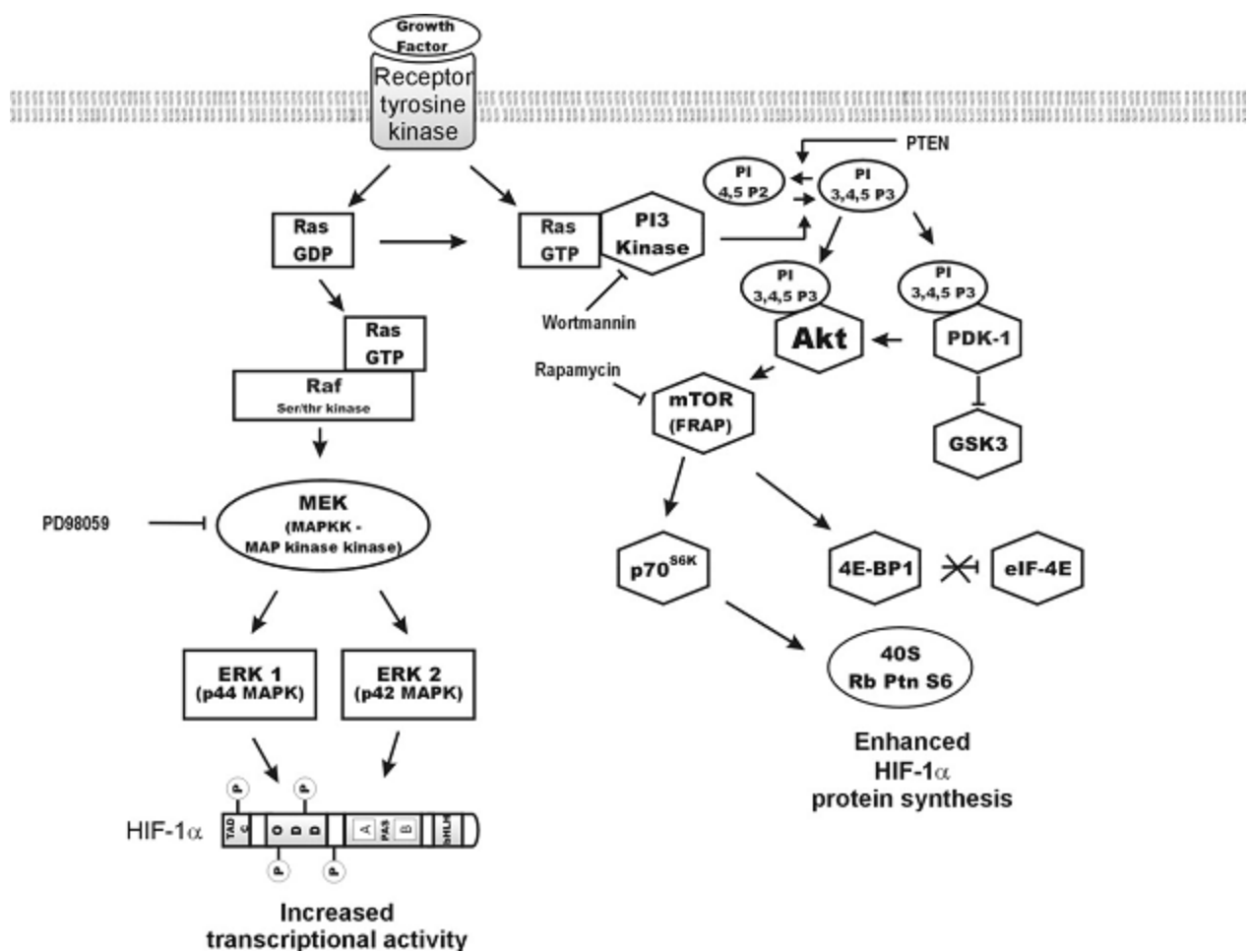


Figure 1.6. Influence des facteurs de croissance sur la quantité de HIF-1 α et sur l'activité de HIF1.

Les facteurs de croissance dont l'expression est induite par HIF1 peuvent effectuer un feed-back positif en promouvant l'accumulation de HIF1 α . Les deux voies menant à une transcription accrue des gènes cibles de HIF-1 sont représentées. L'une par les ERK1/2 aboutit à des phosphorylation du facteur, augmentant ainsi son pouvoir transcriptionnel, l'autre impliquant la PI3K et Akt augmentent la traduction de certains messagers tel celui de HIF-1 α (Höpfl *et al.*, 2004).

le haut métabolisme glycolytique qu' il induit apporte un énorme avantage aux tumeurs qui peuvent en plus jouir de précurseurs de nucléotides en quantité.

1.2.7. Amélioration du potentiel d' oxygénation de l' organisme

Outre une adaptation énergétique au manque d' O₂ par augmentation de la glycolyse, le facteur HIF-1 peut aussi améliorer la condition des tissus sous-oxygénés en promouvant de manière générale le potentiel d' oxygénation de l' organisme comme celui des zones hypoxiées.

HIF-1 promeut l' adaptation au niveau de l' organisme en augmentant le taux de transcription de l' érythropoïétine (EPO) et des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme du fer. L' EPO est une glycoprotéine qui stimule la croissance, prévient l' apoptose, et promeut la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en érythrocytes. Bien que la régulation de l' érythropoïèse soit le rôle majeur de l' EPO, la présence de son récepteur a récemment été rapportée au niveau de plusieurs tissus et cellules non hématopoïétiques telles les cellules du système nerveux central, les cellules endothéliales et les cellules de certaines tumeurs solides (Farrell and Lee, 2004).

L' augmentation du nombre de globules rouges permet une adaptation systémique de l' organisme en accroissant son potentiel d' oxygénation. Cependant cette production accrue requiert des matières premières tel le fer contenu dans le tétrapyrole de l' hémoglobine. Ce fer, si important va donc devoir être métabolisé en conséquence. Il le sera par surexpression des gènes codant les protéines requises à son assimilation ; la transferrine, le récepteur à la transferrine et la céruloplasmine, aussi appelée ferroxidase responsable de l' oxydation du fer ferreux en fer ferrique. Cette oxydation est indispensable à sa fixation par la transferrine.

En plus de cette adaptation systémique, une amélioration de l' oxygénation locale a lieu par augmentation de la vascularisation du tissu hypoxique ainsi que par la perméabilisation et la dilatation des vaisseaux sanguins. En hypoxie, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un des plus puissants facteurs angiogéniques dont la transcription est activée par HIF-1, est surexprimé. Celui-ci va stimuler les cellules endothéliales et en induire la prolifération et la migration vers les tissus privés d' oxygène (Neufeld *et al.*, 1999 ; Berra *et al.*, 2000 ; Harris, 2000 ; Josko *et al.*, 2000). Il en résultera des capillaires fortement fenestrés qui vasculariseront la zone hypoxique. Des modifications du flux sanguin locales ont également lieu, elles sont occasionnées par le NO, le CO, l' adrénomoduline, ou les récepteurs $\alpha 1\beta$ -adrénergiques. Tous ces derniers sont des produits directs ou indirects de gènes induits par HIF-1. Le NO et le CO sont respectivement les produits de la NO synthase et de l' hème oxygénase.

1.2.8. La survie et prolifération cellulaire.

HIF-1 peut promouvoir la survie et la prolifération cellulaire par augmentation de l' expression de divers facteurs de croissance : le PDGF B (Platelet-derived Growth Factor B), le TGF- β (Transforming Growth Factor β), l' IGF-2 (Insulin-like Growth Factor-2), l' EGF (Epidermal Growth Factor) (Vaupel, 2004 ; Feldser *et al.*, 1999 ; Krishnamachary *et al.*, 2003). Ces différents mitogènes, en se liant à leur récepteur, vont augmenter l' activité de HIF1 en accroissant la quantité et le pouvoir transcriptionnel, opérant ainsi un feed-back positif (Figure 1.6.). L' activation transcriptionnelle est accrue par des phosphorylations de HIF1 catalysées par les p44 MAPK/ERK1 et p42 MAPK/ERK2 activées en réponse à la stimulation des récepteurs à tyrosine kinase.

L' accroissement de la quantité de HIF-1 quant à elle se fait par augmentation de la traduction du messager de HIF-1 α et ce indépendamment de la coiffe. Cette augmentation du taux de traduction est le résultat de l' activation de la PI3K, qui va aboutir à une phosphorylation « activatrice » de la protéine S6 de la sous-unité 40S du ribosome, et à une dé-répression de la protéine EIF-4E par inactivation de 4E-BP1 (qui lui est normalement associée et l' inhibe) (Bilton and Booker, 2003).

1.3. HIF et le cancer

Avec les avancées de la recherche et les découvertes récentes faites dans ce domaine, il semble de plus en plus que l' hypoxie, et plus particulièrement le facteur de transcription HIF-1 activé par celle-ci, joue un rôle primordial dans la croissance et la malignité des tumeurs. Ce facteur est donc de plus en plus proposé comme cible de thérapie anticancéreuse, et de nombreuses recherches visant à trouver des molécules capables d' inhiber sa liaison à l' ADN ou son pouvoir de transactivation sont en cours.

Une des caractéristiques des tumeurs solides est que lorsqu' elles croissent, leur centre devient de plus en plus éloigné des capillaires sanguins des tissus voisins, cet éloignement s' accentue au fur et à mesure de la croissance. Comme la distance maximale de diffusion efficace de l' oxygène n' est que de 01 mm dans les tissus, le centre de la tumeur devient très vite hypoxique, et le facteur HIF-1 est activé. Dans un premier temps, cette activation est une réponse au stress que représente l' hypoxie et permet de faire face aux conditions. Mais à long terme, cette hypoxie devient problématique pour l' organisme car via l' action de HIF-1, elle offre plusieurs avantages aux cellules cancéreuses situées dans les zones hypoxiques de la tumeur. Les mécanismes par lesquels HIF-1 promeut la survie, la prolifération et la malignité sont multiples, mais deux sont d' une importance cruciale. Il s' agit de l' hyperactivation de la glycolyse et de la néo-angiogénèse tumorale.

1.3.1. L' augmentation de la glycolyse

Grâce à la phosphorylation au niveau du substrat, cette glycolyse permet une production d' ATP en l' absence de phosphorylation oxydative efficace. Cependant, elle peut remplir d' autres fonctions. En effet, comme certains intermédiaires de la glycolyse sont des précurseurs de synthèse des nucléotides, les cellules tumorales exposées à des conditions d' hypoxie permanente ont un flux glycolytique élevé et disposent donc en abondance de précurseur de nucléotides pour se diviser. Cette glycolyse élevée est de plus responsable de l' acidification du tissu par accumulation d' acides lactique et pyruvique. Ceux-ci tendent à activer indépendamment de l' O₂ le facteur HIF-1 en stabilisant la sous unité HIF-1 α (Verma and Forbes, 2002). De ce fait les cellules tumorales ont un flux glycolytique élevé, même en normoxie, c' est l' effet Warburg.

L' acidose engendrée par la glycolyse élevée peut de plus être mutagène et provoquer des altérations dans la structure des chromosomes (Nagaki *et al.*, 1992). Le micro-environnement acide qui règne dans les tumeurs entraîne une sélection des cellules les mieux adaptées et une évolution vers une population résistante à la toxicité découlant de l' acidité. Les ions H⁺ responsables de l' acidose peuvent diffuser le long d' un gradient vers les tissus péri-tumoraux sains. Les cellules composant ces tissus n' étant pas adaptées pour vivre dans ces conditions d' acidité meurent, laissant ainsi la place aux cellules tumorales. Le faible pH pourrait également augmenter l' invasivité des tumeurs en accroissant la production ou l' activité d' enzymes dégradant la matrice extracellulaire comme les collagénases (Turner, 1979 ; Schlappack *et al.*, 1991).

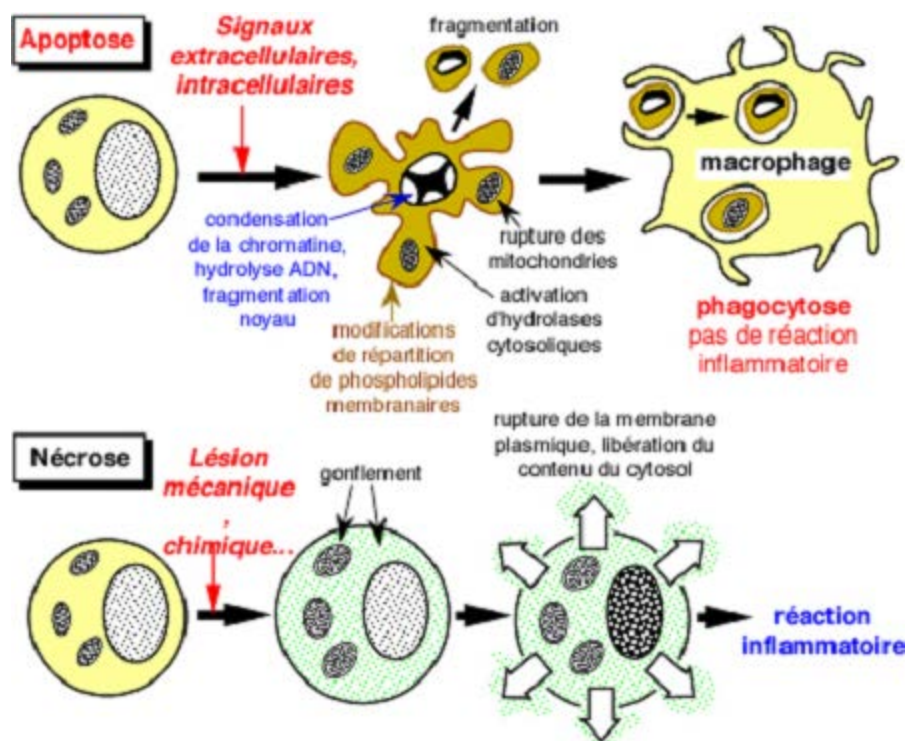


Figure 2.1. Comparaison entre l'apoptose et la nécrose.

(http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/apoptose.html)

1.3.2. La néoangiogenèse tumorale

L'activité de HIF1 provoque la synthèse de VEGF et de diverses molécules agissant sur le flux sanguin et la perméabilité des vaisseaux. Le VEGF entraîne le développement de capillaires sanguins à partir des vaisseaux les plus proches vers les zones hypoxiques de la tumeurs, c'est le processus de néo-angiogenèse. Les autres molécules entraînent un état de dilation et de perméabilité constante des capillaires néoformés. Les capillaires formés au niveau des tumeurs sont fonctionnellement et structurellement anormaux. Ils présentent une paroi fine dépourvue de lame basale, ils sont très fortement fenestrés, excessivement tortueux, et possèdent de nombreux shunts artério-veineux. De part leurs anomalies, ces capillaires ne sont pas en mesure de desservir en O₂ de manière constante et efficace toutes les zones de la tumeurs. Le flux sanguin y est irrégulier, et certaines zones vascularisées, sont soumises à des cycles hypoxie réoxygénation d'une période allant de la minute au jour.

Bien qu'irrégulière et imparfaite, cette vascularisation apporte cependant un avantage aux tumeurs et une sécrétion importante de VEGF (qui témoigne d'une activité angiogénique) est souvent associé à un diagnostic défavorable. En effet, en plus d'apporter de l'O₂ et des nutriments, elle peut servir de porte de sortie à certaines cellules et favoriser la dispersion de métastases. En effet, dans certaines tumeurs, 15% des capillaires contiennent des cellules tumorales.

1.3.3. Autres

L'activité de HIF1 peut encore favoriser la survie et la croissance des cellules tumorales de différentes autres façons.

Ainsi, en induisant l'expression d'une glycoprotéine membranaire de 170 kDa appelée MDR1 (Multi Drugs Resistance 1) qui est un transporteur de type ABC (ATP Binding Cassette) capable de pomper activement certaines molécules chimiothérapeutiques hors de la cellule, HIF-1 améliore la résistance des cellules aux traitements.

Ce facteur de transcription exerce également ses actions bénéfiques sur les tumeurs en modulant l'expression de protéines régulant la mort cellulaire ou apoptose.

Afin de mieux comprendre comment HIF-1 peut intervenir dans ce processus, l'apoptose sera détaillée dans la seconde partie de cette introduction.

2. L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée que tous les métazoaires ainsi que les levures possèdent. C'est un processus séquentiel hautement régulé par lequel une cellule endommagée, ou devenue inutile voire nuisible, se suicide.

Elle joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Kerr *et al.*, 1972 ; Wyllie, 1987). Du bon déroulement de l'embryogenèse jusqu'au maintien d'un organisme âgé en bonne santé par élimination des cellules dangereuses, l'apoptose joue un rôle important tout au long de la vie d'un organisme. Des dérégulations aboutissant à une mort excessive ou insuffisante sont associées à diverses pathologies. Ainsi, une déficience est plutôt associée à un processus de tumorigénèse alors qu'une apoptose excessive sera associée à des maladies dégénératives. Ce processus conservé peut être initié par la cellule elle-même percevant des dommages internes importants et irréparables, cela s'appelle la voie intrinsèque. L'apoptose peut également être initiée par un ordre externe à la cellule provenant par exemple d'un acteur tel qu'un effecteur

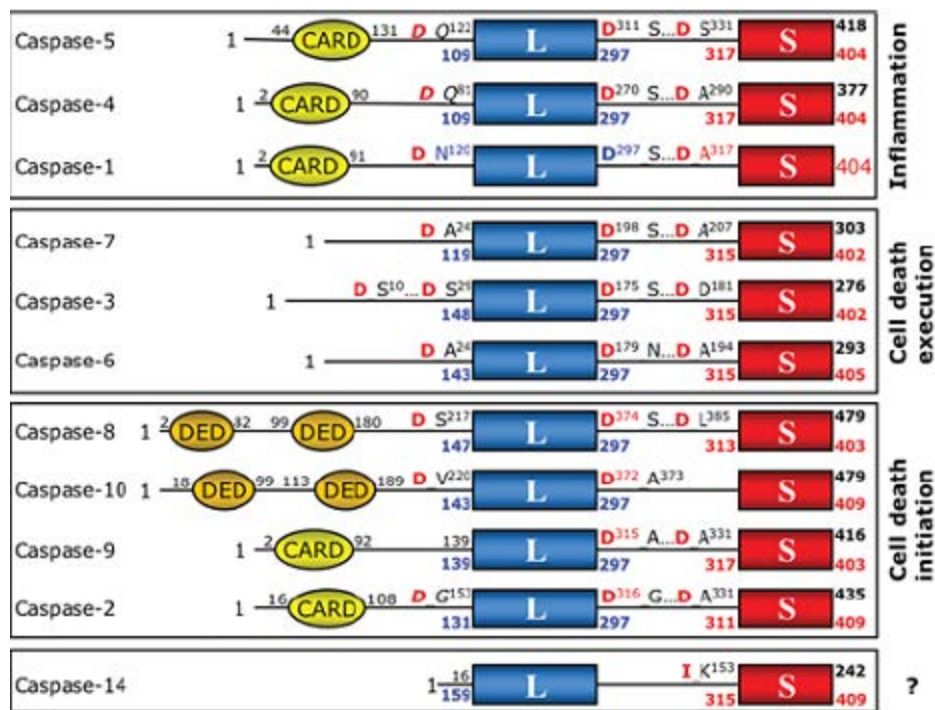


Figure 2.2. Les différents types de caspases.

Les caspases exécutrices, 3, 6, et 7, ont un court prodomaine, alors que les initiatrices, 2, 9, 10, et 8 ont un long prodomaine nécessaire à leur autoactivation durant l'initiation de l'apoptose. En plus des caspases habituellement classées comme effectrices ou initiatrices, il existe également des caspases dites inflammatoires, car elles clivent durant l'inflammation des précurseurs de cytokines proinflammatoires pour les activer. On ne sait pour le moment pas encore si elle ont un rôle particulier dans l'apoptose. 14 caspases sont à l'heure actuelle connues chez les mammifères.

(Fuentes-Prior and Salvesen, 2004)

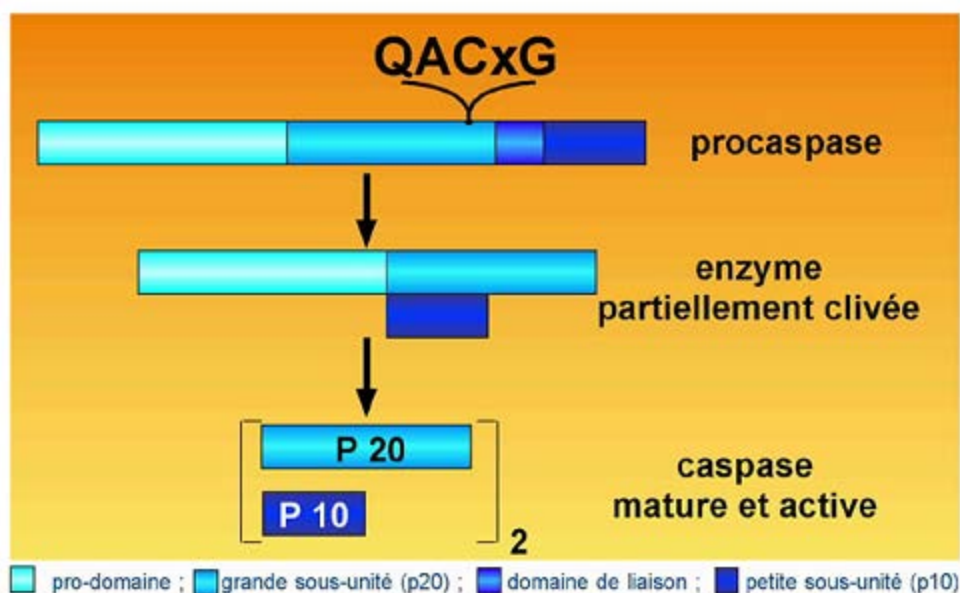


Figure 2.3. Activation des caspases par clivages protéolytiques successifs.

(<http://www.123bio.net/revues/jericci/fig2.html>)

du système immunitaire, c' est la voie extrinsèque. La cellule peut aussi finir par déclencher l' apoptose suite à une absence prolongée de signaux de survie tels ceux induits par les facteurs de croissance. Toutes ces manières différentes d' initier le processus aboutissent au même mécanisme : l' activation d' acteurs cellulaires appelés caspases (Cysteiny Aspartate Specific Protease) qui vont se charger de dégrader divers composants de la cellule. Les caspases sont constitutivement présentes dans la cellule mais maintenues sous forme inactive tant que l' ordre de mort n' est pas reçu.

2.1. Caractéristiques de cellules en apoptose et comparaison avec la nécrose.

L' apoptose et la nécrose sont deux processus fort différents qui aboutissent au même résultat : la mort de la cellule. Alors que l' apoptose est un processus séquentiel, régulé et mené à bien par des composants cellulaires prévus à cet effet, la nécrose est une mort violente et chaotique étant juste la conséquence de conditions insurmontables pour la cellule (*Figure 2.1.*). De plus, elle ne fait pas intervenir des acteurs telles les caspases, encodés par le génome. Une cellule en apoptose va depuis le déclenchement de celle-ci jusqu'à l' accomplissement de l'acte subir toute une série de changements morphologiques et biochimiques. Morphologiquement, le cytoplasme et la chromatine vont se condenser, la membrane plasmique va se mettre à bourgeonner, et enfin la cellule va se désagréger en petites vésicules appelées corps apoptotiques. Ces derniers vont se faire phagocyter par les cellules avoisinantes ou du système immunitaire. Ce processus est propre : il ne répand pas de cytosol et ne déclenche pas d' inflammation susceptible d' endommager les tissus. Par opposition, la nécrose aboutit à un éclatement de la cellule entraînant épanchement cytosolique et inflammation destructrice pour les cellules avoisinantes.

2.2. Les caspases et leur activation.

Les caspases (Cysteiny Aspartate Specific Protease) sont constitutivement présentes dans les cellules sous forme de zymogène inactif, les procaspases. Ces enzymes appartenant à la famille des cystéines protéases, possèdent au niveau de leur site catalytique un domaine pentapeptidique conservé comprenant les acides aminés suivant ' QACxG' (Faet *et al.*, 2005).

Activées, elles peuvent cliver divers substrats protéiques du coté carboxy de leurs résidus aspartates (Thornberry and Lazebnik, 1998). Il existe deux grandes familles de caspases : les caspases initiatrices et les caspases effectrices (*Figure 2.2.*). Les procaspases initiatrices vont être activées suite au déclenchement du processus d' apoptose et vont avoir comme substrats des procaspases effectrices. Clivées par les caspases initiatrices, les caspases effectrices sont activées et peuvent mener à bien le suicide en clivant divers substrats cellulaires. Les caspases effectrices et initiatrices ont une structure similaire. Elles doivent subir deux clivages protéolytiques successifs pour être activées (*Figure 2.3.*). Elles sont constituées de deux fragments : un gros, p20 et un petit, p10, ainsi que d' un prodomaine. La longueur et la fonction du prodomaine diffèrent très fort d' une caspase effectrice à une caspase initiatrice. Lorsque les clivages ont eu lieu, la petite et la grosse sous-unité de la caspase se rassemblent pour former un dimère, et celui-ci dimérise avec un de ses semblables pour former un tétramère (deux dimères), c' est-à-dire une caspase fonctionnelle (Walker *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Rotonda *et al.*, 1996) (*Figure 2.3.*). Les caspases fonctionnelles peuvent être inhibées en temps normal par des protéines de la famille des IAP (inhibiteurs d' apoptose). Ces IAPs sont de plusieurs genres, et peuvent soit occuper le site actif des caspases en y

insérant un domaine BIR (Baculoviral IAP Repeat), soit les orienter vers la dégradation par le protéasome en les polyubiquitinant. Au moment de l'apoptose, ces inhibiteurs présents pour éviter une activation accidentelle, sont pris en charge par des acteurs mitochondriaux libérés en même temps que le cytochrome c tels Smac/DIABLO et HtrA2/Omi. Smac/DIABLO inhibe les IAPs en s'associant à leur domaine BIR à l'aide d'une séquence térapeptidique particulière de son domaine N-terminal : Ala-Val-Pro-Ile (Shi, 2004). HtrA2/Omi possède également un domaine N-terminal d'interaction avec les IAP lui permettant de les inhiber, mais peut en plus, via son activité sérine protéase, augmenter l'efficacité du suicide (Martins *et al.*, 2003).

L'activation des caspases et l'inhibition de leurs inhibiteurs vont entraîner le clivage d'un grand nombre de substrats, ce qui va provoquer toute une série de modifications biochimiques menant au phénotype apoptotique. L'ADN va être clivé en fragments étant des multiples de 180 bp suite à l'activation de CAD (Caspase Activated DNase) par dégradation caspase dépendante de son inhibiteur iCAD. Ces fragments de 180 bp ou multiples que l'on peut voir comme « DNA ladder » sur gel d'agarose, sont caractéristiques des cellules en apoptose. Au niveau nucléaire, on assiste à un clivage des lamines ainsi que de PARP. Ce dernier poly-ADP-ribosyle bon nombre de protéines en contact avec l'ADN de manière à les en éloigner par répulsion électrostatique et permettre à la machinerie de réparation d'intervenir. Cette opération a pour but une réparation de l'ADN, et c'est un processus coûteux en énergie. En apoptose cela n'a plus lieu d'être, d'autant plus que contrairement à la nécrose, l'apoptose nécessite de l'ATP, et donc PARP sera inhibé suite à son clivage par les caspases effectrices. La membrane cellulaire se voit présenter en son feuillet externe un phospholipide normalement présent dans le feuillet intra-cellulaire uniquement : la phosphatidylsérine. La manière dont les caspases induisent le flip-flop de celle-ci n'est actuellement pas encore comprise. La phosphatidylsérine sert d'étiquette de phagocytose aux corps apoptotiques finalement formés.

2.3. Le rôle de la mitochondrie

Pour que les caspases effectrices soient actives, il faut donc qu'elles subissent un clivage protéolytique, et que leur inhibiteurs soient inhibés. Pour cela, la membrane de la mitochondrie doit être perméabilisée, et les caspases initiateuses doivent pouvoir être clivées.

Ces deux événements se déroulent quel que soit le mode de déclenchement de l'apoptose : voie intrinsèque, voie extrinsèque ou encore absence de signaux de survie.

La mitochondrie joue un rôle très important dans l'apoptose, car elle contient beaucoup d'agents indispensables au bon déroulement de celle-ci. Son espace intermembranaire contient les inhibiteurs d'IAPs, des endonucléases telles AIF et endoG, et enfin le cytochrome c, extrêmement important pour l'activation de la caspase initiateuse 9. La perméabilisation de sa membrane implique des protéines interagissant soit directement avec sa membrane externe, soit avec des complexes de transport préexistants tels VDAC (Voltage Anion Dependant Channel) et ANT (Adenine Nucleotide Translocase) et en en modifiant la spécificité. Le complexe ainsi formé est appelé PTP (Permeability Transition Pore). Les protéines favorisant cette perméabilisation sont dites pro-apoptotiques, et leur effet est en temps normal contrôlé par des protéines dites anti-apoptotiques. Ces protéines appartiennent à la famille Bcl-2

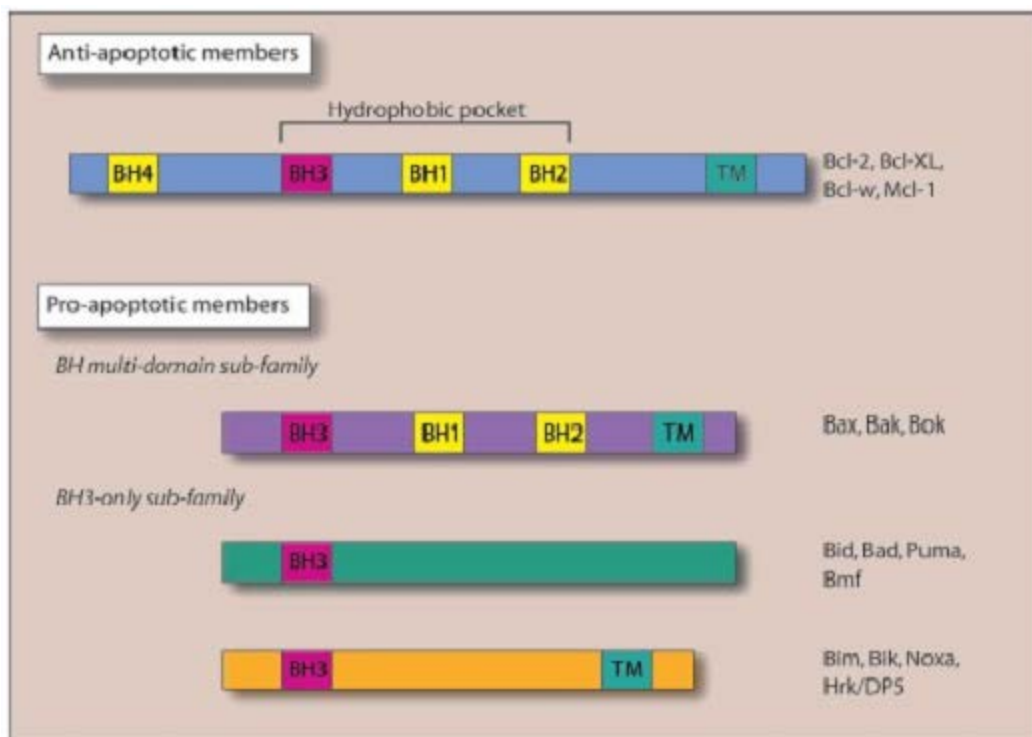


Figure 2.4. Les protéines de la famille Bcl-2.

Toutes les protéines de cette famille ont la particularité de posséder un ou plusieurs domaines BH qui sont au nombre de quatre : BH1, BH2, BH3, BH4. Cette famille peut être divisée en deux sous familles : les protéines anti-apoptotiques, et les protéines pro-apoptotiques. Les anti-apoptotiques possèdent les quatre domaines BH ainsi qu'un domaine transmembranaire ciblant leur destination intra-cellulaire. Les pro-apoptotiques peuvent être réparties en deux groupes, les Bax-like, possédant un domaine transmembranaire et tous les domaines BHs à l'exception du 4, et les BH3 only ne possédant que le BH3, et pour certaines un domaine transmembranaire. Les domaines BH1-3 des anti-apoptotiques forment une poche hydrophobe pouvant interagir avec le domaine BH3 des pro-apoptotiques (Bras *et al.*, 2004).

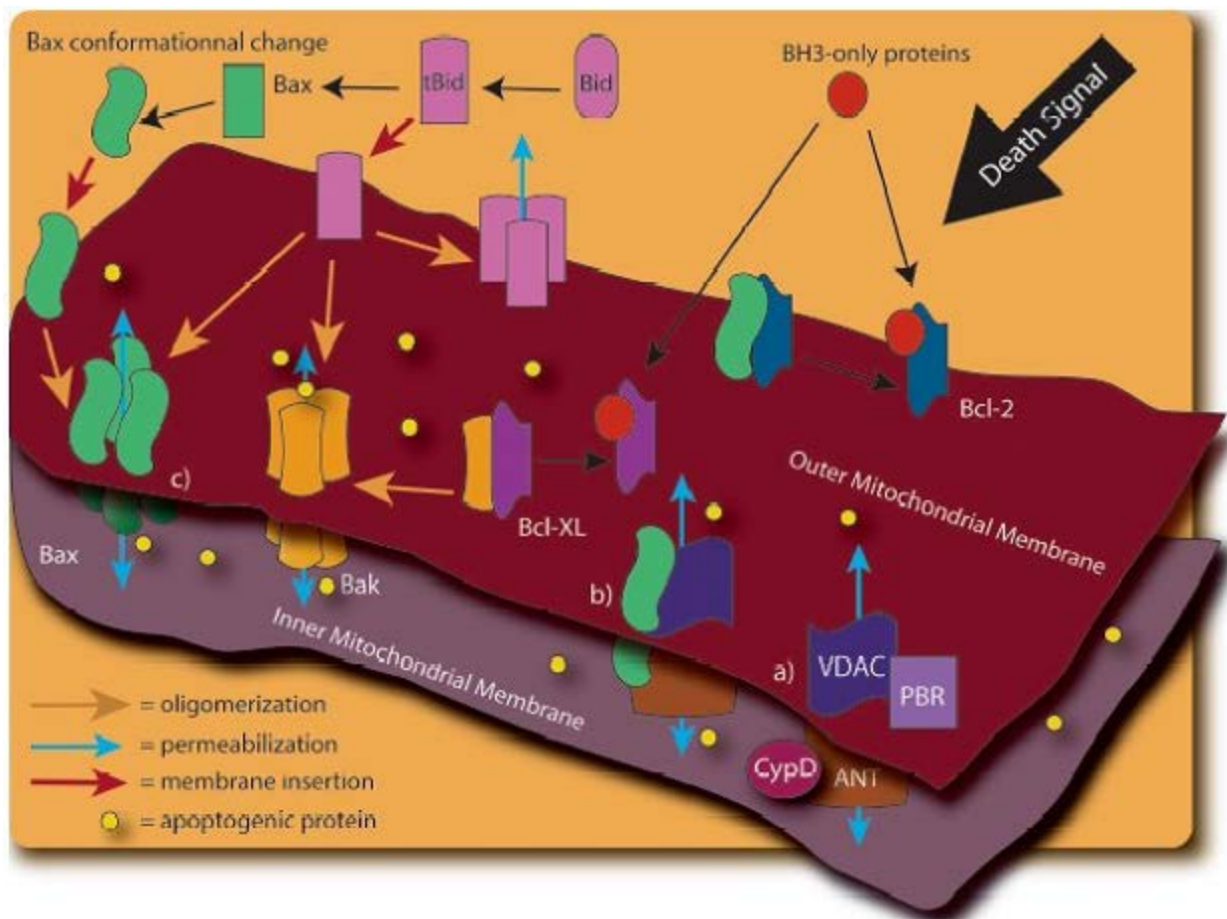


Figure 2.5. Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, les différents modèles (Bras *et al.*, 2004).

- Les différents composants permettant la formation du PTP (Permeability Transition Pore), VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), ANTI (Adenine Nucleotide Translocase), CypD (Cyclophilin D) et PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor).
- Selon le premier modèle, les pro-apoptotiques comme Bak et Bax qui sont en temps normal séquestrés par les anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-XL, peuvent, lorsqu' ils ne sont plus inhibés par les anti apoptotiques, s' associer à ANTI, VDAC, CypD et PBR pour former un complexe appelé PTP qui permettrait la fuite du contenu de l' espace inter-membranaire vers le cytosol.
- Selon le second modèle, Bak et Bax peuvent s' oligomériser et former des pores lorsque l' équilibre bascule en faveur de ces pro-apoptotiques ou lorsque les anti-apoptotiques sont inactivés par des protéines du type BH3-only. Certains pensent que t-Bid (activé par un clivage lors du déclenchement de l' apoptose par la voie extrinsèque) peut, en plus d' empêcher la séquestration des pr apoptotiques comme le font les membres de la famille BH3-only, jouer un rôle dans l' oligomérisation de Bak et Bax.

2.4. Les protéines de la famille Bcl-2

Ces protéines regroupent des protéines anti et pro-apoptotiques. Toutes ces dernières, anti- ou pro-apoptotiques, ont en commun un ou plusieurs domaines appelés BH (Bcl-2 Homology) qui sont au nombre de quatre : BH1, BH2, BH3 et BH4 (Kelekar et Thompson, 1998). Certaines ne partagent avec les autres que le domaine BH3 et sont appelées BH3-only (*Figure 2.4.*).

2.4.1. Les protéines anti-apoptotiques

A l'exception de Mcl1 qui ne possède que les trois premiers domaines BH, toutes les protéines de cette famille (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Boo, Bcl-B) possèdent les quatre domaines BH. Elles empêcheraient les protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak) de perméabiliser la mitochondrie en temps normal en s'associant à celles-ci. En effet, Bax et Bak entraînent la mort soit en s'oligomérisant et en formant des pores dans la membrane mitochondriale externe, soit en s'associant au PTP (*Figure 2.5.*). L'association avec le PTP entraînerait deux choses. D'abord, Bax et/ou Bak associé au PTP en modifierait de manière encore inconnue la perméabilité, lui permettant de laisser diffuser vers le cytosol le contenu de l'espace intermembranaire. Le PTP pourrait en plus dissiper le potentiel de membrane, ce qui aboutirait à un gonflement critique de la mitochondrie faisant éclater la membrane externe en libérant ainsi le contenu de l'espace intermembranaire (Van der Loos *et al.*, 2002). Bcl-2 semble en permanence associé à la face cytosolique de la membrane mitochondriale externe, du réticulum endoplasmique, et de l'enveloppe nucléaire. Mcl1, est par contre cytosolique et Bcl-w ainsi que Bcl-xl ne semblent s'associer aux membranes que suite à des changements allostériques induits par des signaux cytotoxiques (Adams, 2003).

2.4.2. Les protéines pro-apoptotiques.

Celles-ci peuvent être divisées en deux sous-familles : la sous famille des Bax, comprenant Bax, Bak, et Bok et la sous-famille des BH3-only. Les protéines de la première sous-famille possèdent un domaine transmembranaire ainsi que tous les domaines BH à l'exception du domaine BH4. Bak semble, comme Bcl-2, associé au feuillet cytosolique de la membrane mitochondriale externe et du réticulum, alors que Bax est cytosolique et subit durant l'apoptose un changement conformationnel lui permettant de transloquer vers la membrane mitochondriale externe et de s'y oligomériser. La sous famille des BH3-only comprend entre autres Bim, Bid, Bad, Bmf, Bik, Noxa, Puma. Ces protéines n'ont en commun avec les autres protéines de la famille Bcl-2 que le domaine BH3 ainsi que, pour certaines, un domaine transmembranaire. Les protéines BH3-only favoriseraient l'apoptose en empêchant les anti-apoptotiques de séquestrer les pro-apoptotiques, leur permettant ainsi ou d'oligomériser, ou de s'associer au PTP.

La vie ou la mort de la cellule dépend de l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. Si cet équilibre est rompu et bascule en faveur des membres pro-apoptotiques, la membrane mitochondriale externe est perméabilisée et le processus d'exécution de l'apoptose est déclenché.

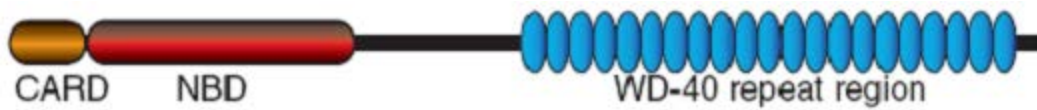


Figure 2.6. Structure de Apaf-1. (Hill *et al.*, 2003).

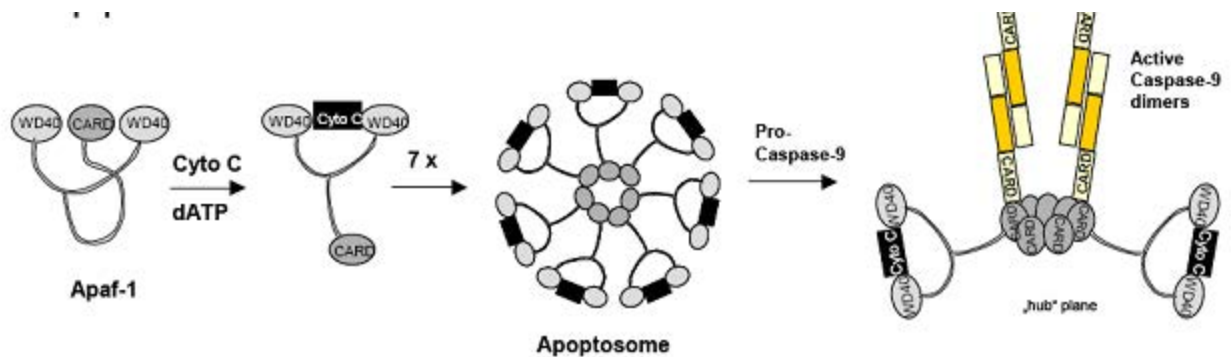


Figure 2.7. Cinétique de formation de l' apoptosome.

Apaf-1 est en temps normal présent dans le cytosol sous forme repliée avec son domaine CARD enfoui dans les répétitions WD40. Lorsque le cytochrome c est libéré, Apaf-1 va par ses motifs WD40 s'y associer, et adopter une conformation lui permettant de complexer de l' ATP. Une fois l' ATP complexé, le complexe cyt c, Apaf1 et ATP est stable et dans une conformation permettant d' heptamériser. Cette structure en forme de roue au centre de laquelle les domaines CARD sont rassemblés, peut alors recruter les procaspases 9 via leur domaine CARD et les y activer (Gewies, 2003).

2.5. L' apoptosome et l' activation de la procaspase 9

Toutes (ou presque) les voies d' activation de l' apoptose mènent à la perméabilisation de la mitochondrie, et donc à la libération du cytochrome c. Celui-ci va s' associer avec une protéine cytosolique, Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) et la procaspase 9 pour former en présence d' ATP ou de dATP une structure à symétrie heptamérique imposante (1 mégadalton) : l' apoptosome. L' apoptosome va permettre l' activation de la procaspase 9 qui pourra ensuite activer les caspases 3 et 7 (Adams, 2003). La caspase 3 va ensuite activer la caspase effectrice 6 qui va elle-même activer les caspases initiatrices 8 et 10 provoquant ainsi un feed-back positif menant à une amplification de la cascade de caspases (Hill *et al.*, 2003). Apaf-1 est en temps normal présent sous une forme inactive dans le cytosol. C' est la pièce maîtresse de l' apoptosome à partir de laquelle le complexe va s' assembler et activer la procaspase 9. Il comporte trois domaines bien distincts : un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) du côté N-terminal, un domaine NBD (Nucleotide Binding Domain) en son centre, et enfin 12 à 13 répétitions d' un motif appelé WD 40 du côté C-terminal (*Figure 2.6.*). L' interaction avec la procaspase 9 se fait via le domaine CARD que les deux protéines ont en commun. Le motif NBD permet une liaison d' ATP ou de dATP, et enfin, les répétitions WD 40 sont des zones d' interaction protéine-protéine permettant de recruter le cytochrome c (Hill *et al.*, 2003). En temps normal, Apaf-1 est replié sur lui-même avec son domaine CARD enfoui dans les répétitions WD 40. Lorsque le cytochrome c vient s' y fixer, il adopte une conformation plus ouverte découvrant ainsi partiellement son domaine CARD et lui permettant en plus de fixer de l' ATP via le motif NBD. La liaison de l' ATP va rendre le domaine CARD pleinement accessible et maintenir Apaf-1 dans une conformation propice à son association activatrice avec la procaspase 9 (Hill *et al.*, 2003) (*Figure 2.7.*). Une fois cette conformation stable atteinte, le complexe heptamérise, et forme une structure circulaire au centre de laquelle les domaines CARD de Apaf-1 peuvent alors rassembler les procaspases 9 de manière à ce qu' elles s' autoactivent par clivage.

2.6. L' apoptose: la voie intrinsèque, dommages à l' ADN.

Cette voie est initiée en réponse à divers dommages internes à la cellule, principalement au niveau de l' ADN, perçus par des systèmes senseurs. Les agents engendrant ces dommages peuvent être de diverses natures (rayonnements ionisants, ROS, virus, molécules toxiques exogènes, stress thermiques et autres) et n' induisent pas tous systématiquement l' apoptose. En fonction de la gravité des dommages et du type cellulaire, la réponse pourra s' orienter vers la réparation ou vers l' apoptose.

Dans le cas de dommages à l' ADN, il existe deux protéines de la famille des PI3K, ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related) capables de s' activer respectivement en réponse à des cassures double brin, ou à des fourches de réplication bloquées (Yang *et al.*, 2004).

Suite à leur activation, ces protéines peuvent entre autres phosphoryler p53 sur la serine 15, ce qui va augmenter son activité transcriptionnelle (Yang *et al.*, 2004). ATM va de plus réaliser une phosphorylation inhibitrice de l' ubiquitine ligase de p53, HDM2 (Human Double Minute 2, équivalent du MDM2 murin), qui en temps normal destine son substrat à sa dégradation protéasomiale (Khosravi *et al.*, 1999, Maya *et al.*, 2001). Cette stabilisation de p53 ainsi que l' augmentation de son activité transcriptionnelle, mène à l' augmentation de la transcription de ses gènes cibles. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques telles Noxa, Puma, Bid, Bax, mais aussi la caspase 6, Apaf-1 et Fas (Haupt *et al.*, 2003). Cette augmentation de l' expression de protéines pro-apoptotiques va engendrer la

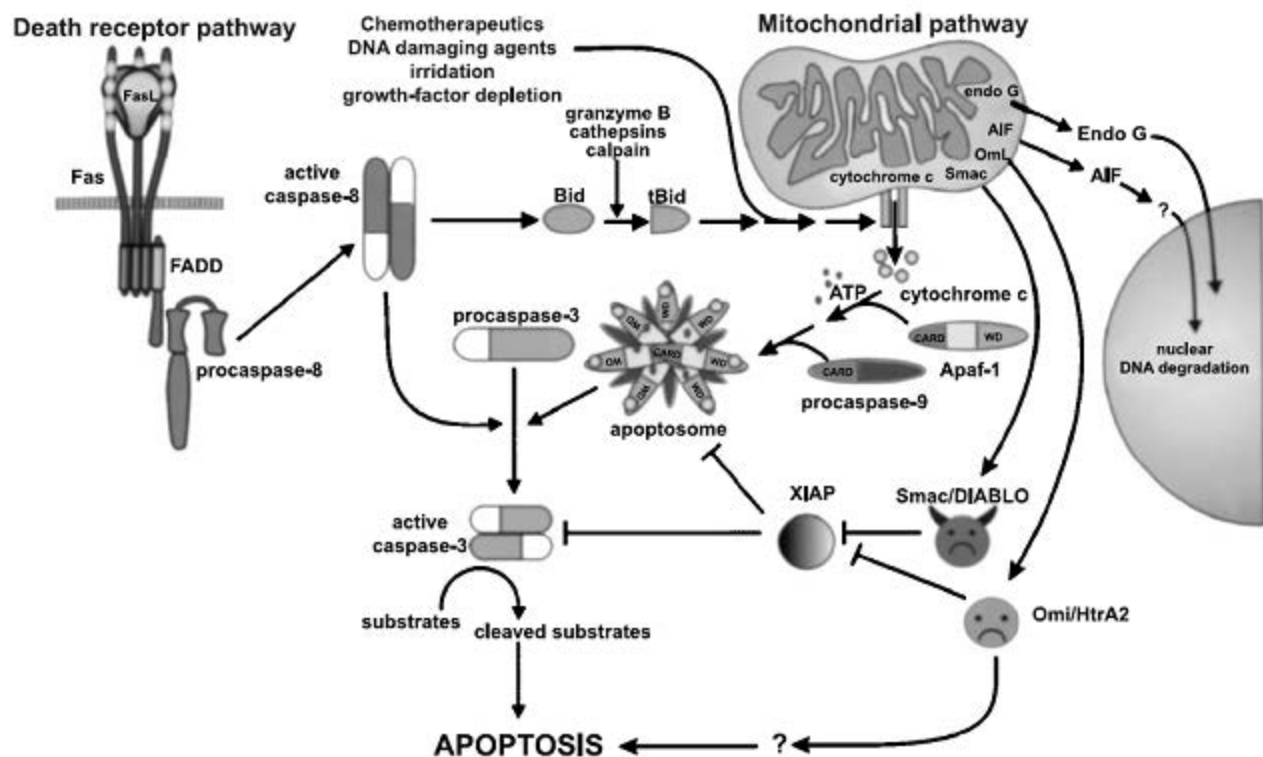


Figure 2. 8. Schéma général de l'apoptose.

Ce schéma représente les voies intrinsèque (Mitochondrial pathway) et extrinsèque (Death receptor pathway) menant à l'apoptose.

La voie intrinsèque : Divers stress peuvent conduire à un déséquilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques, qui pourront perméabiliser la membrane mitochondriale externe et ainsi permettre le largage du cytochrome c, des inhibiteurs d' IAP (Smac/DIABLO et HtrA2/Omi), d' endoG et d' AIF. Le cytochrome c va induire la formation de l' apoptosome au sein duquel les pro-caspases initiatrices 9 pourront être activées. Une fois activées, elles vont cliver les caspase effectrices 3 qui mèneront à bien le suicide en agissant sur différents substrats. AIF et endoG peuvent agir de concours au niveau du noyau pour dégrader la chromatine, et AIF pourrait de manière encore inconnue augmenter l' efficacité du processus de mort en influant à plusieurs niveaux indépendamment des caspases. Il a en effet été montré qu' une sur-expression de AIF pouvait induire une dissipation du potentiel de membrane mitochondriale et une exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane cytoplasmique. (Van loo *et al.*, 2002)

La voie extrinsèque : Lorsqu' un récepteur de mort tel Fas est stimulé par son ligand, il trimérise et peut alors via son domaine DD recruter l' adaptateur FADD auquel vont venir s' associer les pro-caspases 8 pour y être activées. Elles pourront alors déclencher l' apoptose soit en clivant directement la caspase effectrice 3, soit en induisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par l' intermédiaire de tBid. (Van loo *et al.*, 2002).

perméabilisation mitochondriale, et donc le relargage du cytochrome c, qui va entraîner la formation de l'apoptosome et mener la cellule au trépas (*Figures 2.8. et 2.9.*).

L'activation de p53 n'a pas pour seul effet d'augmenter le taux transcriptionnel de protéines pro-apoptotiques, il augmente également l'expression de régulateurs du cycle cellulaire comme p21, permettant d'interrompre le cycle cellulaire. Cette interruption peut servir à réparer les dégâts si ceux-ci ne sont pas trop importants.

2.7. La voie extrinsèque

Il existe des récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée: les récepteurs de mort. Une fois stimulés, ils déclenchent une cascade aboutissant à l'activation des caspases. Ces voies de mort sont utilisées par le système immunitaire pour éliminer les lymphocytes autoréactifs, mais également les cellules devenues dangereuses pour l'organisme (infectées par un pathogène intracellulaire par exemple). Ces récepteurs appartiennent à la famille du TNF-R (Nagata, 1997) et sont des protéines transmembranaires possédant du côté extracellulaire une à six régions riches en cystéines impliquées dans la liaison au ligand.

Leur partie intracellulaire est caractérisée par une région conservée de 80 acides aminés appelée DD (Death Domain) (Tartaglia *et al.*, 1993 ; Chaudary *et al.*, 1997 ; Nagata, 1997).

Ces récepteurs sont trimériques et leur trimérisation induite par la liaison du ligand est nécessaire à l'exécution de l'ordre de mort.

2.7.1. La voie Fas

Le récepteur Fas/apo-1/CD95 est une glycoprotéine exprimée par de nombreux types cellulaires. Il possède 3 régions riches en cystéines, et une fois activé par son ligand, Fas-L, il trimérise et peut ainsi recruter un adaptateur du côté intracellulaire : FADD (Fas Associated Death Domain). Cet adaptateur, possède deux domaines bien distincts, le « death domain » (DD) et le « death effector domain » (DED), respectivement situés des côtés C et N terminaux (Kim, 2001). Fas et FADD interagissent via leur Death Domain, et le Death Effector Domain de l'adaptateur FADD permet de recruter les procaspases 8 et 10 par le DED situé dans leur long prodomaine. Le complexe ainsi formé à partir du récepteur trimérisé s'appelle DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Au sein de celui-ci, les procaspases 8 ou 10 rassemblées subissent un autoclivage protéolytique menant à leur activation (Medema *et al.*, 1997 ; Salvesen *et al.*, 1999) (*Figures 2.8. et 2.10.*). Une fois activées, elle peuvent, en fonction du type cellulaire, déclencher la mort soit par clivage et donc activation directe de la caspase 3 (dans les lymphocytes), soit par clivage de Bid en t-Bid (Adams, 2003). Bid est une protéine BH3-only qui une fois clivée, peut induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. La ou les manière(s) par lesquelles t-Bid agit ne sont pas encore bien décrites. Il semblerait qu'il puisse agir directement en empêchant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 de séquestrer les membres pro-apoptotiques de cette famille, mais qu'il puisse en plus, en s'associant directement à Bak ou Bax, en induire l'oligomérisation pour former des pores. Bid peut également être directement clivé par les granzymes libérés par les Natural Killer et les lymphocytes T cytotoxiques.

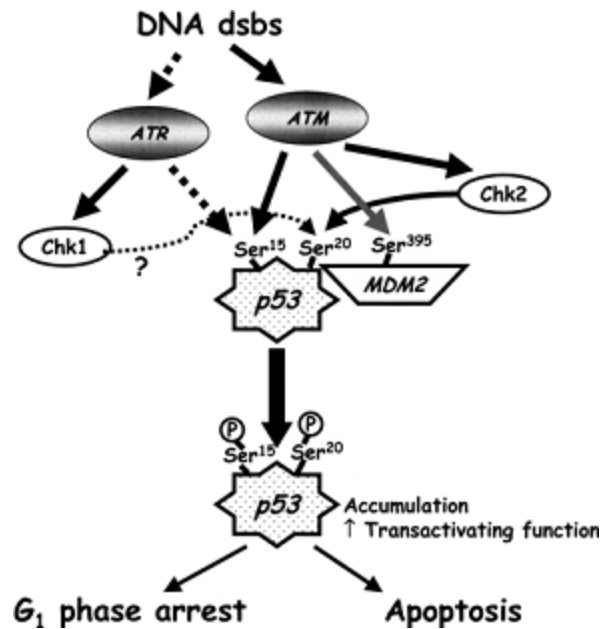


Figure 2.9. Activation de p53 en réponse à des dommages à l' ADN.

Lorsque des cassures ou des anomalies telles des fourches de réplication bloquées ou des « bulles » apparaissent dans l' ADN, des kinases de la famille des PI3K comme ATM et ATR sont activées. Elles peuvent alors phosphoryler directement ou indirectement via Chk1 et 2 (Checkpoint Homolog 1 et 2) la protéine suppresseur de tumeurs p53 et son ubiquitine ligase MDM2 (HDM2 chez l' homme). Ces phosphorylation vont aboutir à une stabilisation de p53 par une diminution de son affinité pour son ubiquitine ligase et par inhibition de celle-ci, ainsi qu' à une augmentation de son affinité pour l' ADN et de son pouvoir de transactivation. En fonction des dégâts et du type cellulaire, la réponse sera orientée vers la réparation, ou la voie intrinsèque de l' apoptose (via la sur-expression de pro-apoptotiques comme Bax, Noxa, Puma, Bid) (Abraham, 2001).

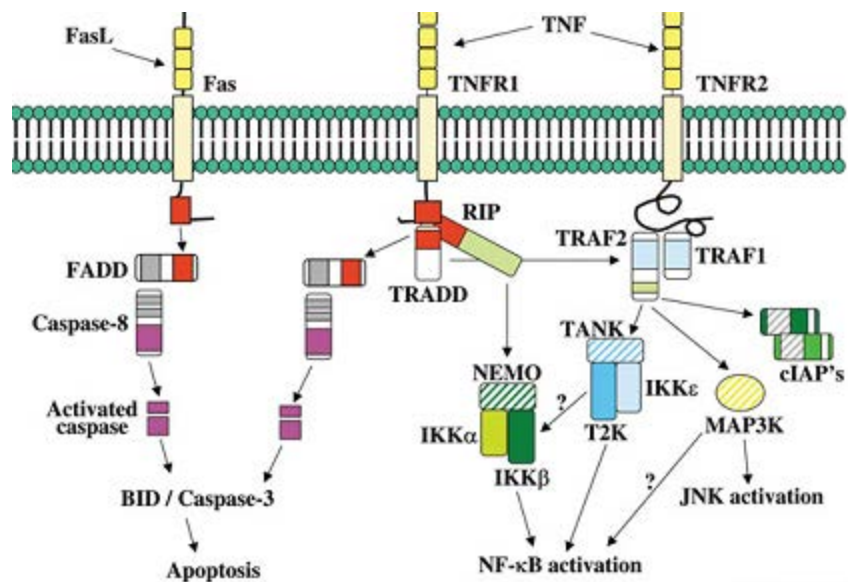


Figure 2.10. Fas et les récepteurs au TNF

Fas et TNFR1 peuvent tous deux recruter l' adaptateur FADD par lequel aura lieu l' activation de la caspase 8 préliminaire au déclenchement de l' apoptose. Cependant, le récepteur 1 au TNF peut aussi, selon le type cellulaire et les stimulations précédentes de la cellule, recruter TRAF-2 par lequel sera mis en place un complexe d' activation de NF-κB. La réponse cellulaire sera dans ce cas de type inflammatoire (<http://arthritis-research.com/content/figures/ar569-1.jpg>).

2.7.2. La voie du TNF α

Le TNF α est une molécule produite par les lymphocytes T et les macrophages en réponse à une infection ou une situation inflammatoire. Lorsque celui-ci se lie à son récepteur, le TNFR1, il peut induire dans la cellule, en fonction du type cellulaire, soit une réponse immunitaire avec activation de NF- κ B et d'AP-1, soit l'apoptose.

Lorsque le TNF se lie à son récepteur, il en induit la trimérisation, ce qui lui permettra de recruter par son domaine de mort cytoplasmique la protéine TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain). Par l'intermédiaire de celle-ci, en fonction du type cellulaire et des stimulations précédentes, sera recruté FADD ou TRAF-2. Si FADD est recruté, il pourra activer la caspase 8 et donc déclencher l'apoptose. Par contre si TRAF2 est recruté, la réponse cellulaire sera plutôt orientée vers la survie, l'activation de NF- κ B, et l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (*Figure 2.10.*).

2.8. L'absence de signaux de survie

Une stimulation permanente de la cellule par des signaux de survie tels ceux induits par les facteurs de croissance permet à celle-ci de rester en vie. Les facteurs de croissance en se liant à leur récepteur à tyrosine kinase, activent entre autres une enzyme appelée PI3K. La PI3K activée va mener à l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt/PKB qui pourra phosphoryler plusieurs substrats dont Bad et la caspase 9. La phosphorylation de Bad va mener à sa séquestration par une protéine appelée 14-3-3, l'empêchant ainsi de remplir son rôle d'antagoniste de Bcl2, tandis que celle de la caspase 9 sur sa sérine 196 va l'inactiver (Rosenquist, 2003). En l'absence de signaux de survie, Bad n'est plus phosphorylé ni séquestré, et la caspase 9 n'est plus inhibée, tous deux peuvent alors remplir leur fonction pro-apoptotique.

2.9. L'apoptose et le cancer

L'apoptose est, comme l'hypoxie un processus cellulaire qui joue un rôle important dans le développement du cancer. En effet, l'apoptose, censée se déclencher en réponse à des dommages internes importants et irréparables, ne se déclenche plus dans la majorité des cellules tumorales (ou du moins les dommages traduisant une anomalie cellulaire grave ne suffisent plus). La sur-expression de protéines anti-apoptotiques et/ou la dysfonction des mécanismes pro-apoptotiques normaux font, au même titre que les mutations au sein des oncogènes, partie du mécanisme de tumorigenèse.

Une cellule se transforme en cellule cancéreuse à la suite d'une accumulation de mutations au niveau des gènes entrant dans la régulation du cycle cellulaire, les oncogènes. Des mutations fréquemment répertoriées sont par exemples celles de la petite protéine G Ras, la maintenant en permanence sous sa forme activée. Ou encore des mutations dans les récepteurs aux facteurs de croissance leur conférant l'aptitude de transmettre un signal même en l'absence de ligand.

D'autres mutations entraînant des pertes de fonction dans les gènes dit suppresseurs de tumeur sont également très favorables au processus de transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. La protéine p53, le suppresseur de tumeur par excellence, est très souvent mutée dans les tumeurs. Sa mutation apporte un avantage certain aux cellules tumorales car p53 peut entraîner l'apoptose lorsque des dommages sont perçus au niveau de l'ADN. Les cellules tumorales ayant perdu p53 peuvent donc accumuler les mutations et les dommages et

ainsi évoluer vers une forme plus invasive sans risquer un déclenchement de l'apoptose. Toute une série d'autres mutations défavorisant le déclenchement de l'apoptose ont fréquemment été observées dans divers types de tumeurs. Ainsi il a été montré que chez l'homme, les mélanomes présentaient de très haut niveaux de la protéine FLIP, (Flice Like Inhibitory Protein) qui inhibe l'apoptose induite par les récepteurs de mort en limitant l'interaction activatrice entre la caspase 8 et FADD (Igney and Krammer, 2002). Ce genre de mutations confère aux cellules une certaine protection contre l'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T. La surexpression de membres de la famille des IAP comme la survivine est également associée à toute une série de tumeurs humaines particulièrement agressives. Toutes ces modifications du processus de mort programmée permettent non seulement d'accumuler les mutations, mais aussi de mieux résister au système immunitaire. D'un point de vue thérapeutique, cette résistance à l'apoptose est très gênante car beaucoup de traitements destinés à traiter le cancer, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, visent à provoquer des dommages internes comme des cassures dans l'ADN, pour induire de manière forcée l'apoptose. De plus, plus un tissu tumoral évolue, plus la sélection opère et plus les cellules récalcitrantes au déclenchement de ce processus prédominent. Il devient alors très difficile de traiter le patient.

La réponse cellulaire à l'hypoxie et l'apoptose sont donc deux processus « impliqués » dans la carcinogénèse. Depuis la transformation d'une cellule saine jusqu'à son évolution en tumeur maligne résistant aux traitements, les altérations du processus d'apoptose et les avantages amenés par l'activation du facteur HIF-1 en hypoxie jouent un rôle important. En plus d'être impliqués chacun isolément, certaines des conséquences de ces deux processus peuvent avoir des effets synergiques néfastes favorisant la survie des cellules cancéreuses. Par exemple, la résistance aux agents anti-tumoraux provoquée par des altérations du processus apoptotique normal peut encore être accrue par la sur-expression de MDR1 induite par HIF-1. De plus, il semblerait que l'hypoxie puisse dans une certaine mesure protéger de l'apoptose. Certains indices nous permettent de penser que cette protection serait due, au moins en partie, au facteur HIF-1. Cependant, des mécanismes de protection indépendants de HIF-1 mais encore inconnus ne sont pas exclus. Le paragraphe suivant tente de faire le point sur ce qui est connu à l'heure actuelle concernant l'hypoxie et ses interactions avec l'apoptose.

2.10. L'hypoxie et l'apoptose interactions

Lorsqu'une cellule se retrouve en situation d'hypoxie, elle s'adapte et met en œuvre toute une série de mécanismes lui permettant de survivre. Cependant si l'hypoxie est trop sévère et qu'elle se prolonge, la cellule sera éliminée par déclenchement de l'apoptose. La survie, ainsi que l'induction ou la protection de l'apoptose en hypoxie sont tous les deux des mécanismes qui peuvent impliquer des protéines sur-exprimées par HIF-1.

Parmi les gènes sur-exprimés en hypoxie par HIF-1, on retrouve plusieurs protéines de la famille Bcl-2. Au sein de celles-ci, on retrouve des membres pro-apoptotiques : Nip3, NIX, et des membres anti-apoptotiques : Mcl-1. HIF-1 pourrait donc aussi bien faciliter qu'empêcher l'apoptose.

Effectivement, certaines études tendent à présenter HIF-1 comme pro-apoptotique (Carmeliet *et al.*, 1998), d'autres comme anti-apoptotique (Zaman *et al.*, 1999). Il semblerait que ce soit la sévérité et la durée de l'hypoxie qui influence le devenir des cellules: tandis qu'une hypoxie sévère et de longue durée promouvrait l'apoptose, une hypoxie de sévérité modérée et/ou de durée moyenne, entraînerait plutôt la survie.

Ainsi, la protéine pro-apoptotique Nip3, transcriptionnellement régulée par HIF-1, n'est réellement exprimée qu'après quatre jours d'hypoxie sévère frisant l'anoxie (0,5% d' O_2) (Bruick, 2000). De plus, le rôle pro-apoptotique de HIF-1 en hypoxie sévère ne se limite pas qu'à son activité transcriptionnelle. En effet, dans ces conditions, HIF-1 α serait majoritairement présent sous une forme non phosphorylée s'associant avec p53 plutôt qu'avec ARNT, aboutissant à une stabilisation de p53 (Suzuki *et al.*, 2001). Cette association, en plus de stabiliser p53 entraînerait une dégradation de HIF-1 α , et l'hypothèse est avancée que HIF-1 α , p53, et Mdm-2 formeraient un complexe hétérotrimérique au sein duquel HIF-1 α serait préférentiellement ubiquitiné et donc destiné à être dégradé (Höpfl *et al.*, 2004). La stabilisation de p53 engendrerait alors l'apoptose par sur-expression de protéines telles Bax, PUMA et Noxa, encodées par des gènes cibles de ce facteur.

Des conditions d'hypoxie moins contraignantes protègent contre l'apoptose et au moins en partie de manière dépendante de HIF-1. Celui-ci augmente entre autres l'expression d'une protéine de la famille Bcl-2, Mcl-1 (Myeloid Cell Factor 1) qui peut protéger de l'apoptose et promouvoir la survie (Piret *et al.*, 2004). Mcl-1 a été identifiée comme étant surexprimée dans certains types de cancers, laissant supposer qu'elle joue un rôle important dans la survie des cellules tumorales. De plus, lors d'une hypoxie classique, un grand nombre de protéines dont l'expression est induite par HIF-1 sont plutôt liées à l'adaptation de la cellule et à sa survie. Par exemple, tous les facteurs de croissance dont HIF-1 augmente l'expression sont aussi des facteurs de survie, et protègent donc les cellules de l'apoptose. Comme on peut le voir, apoptose et hypoxie sont donc intimement liés et l'issue finale pour la cellule dépend de nombreux facteurs. Le rôle de HIF-1 dans cette issue reste à être clairement défini.

3. Objectifs

L'hypoxie d'une part, et une inhibition des voies apoptotiques d'autre part, sont des facteurs favorisant la survie des cellules tumorales ainsi que leur résistance aux chimiothérapies. De plus, des interactions de l'une avec l'autre commencent à être mises en évidence. Ainsi, bien qu'on ait montré au laboratoire une protection de l'hypoxie contre l'apoptose induite par la déprivation de sérum, le t-BHP, et l'étoposide dans les cellules HepG2, peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur la manière dont celle-ci s'opère et sur les acteurs qu'elle implique. Étant donné que HIF-1 est l'élément majeur de réponse des cellules aux conditions d'hypoxie, et sachant qu'il induit l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1, et de divers facteurs de survie, il semble logique de penser que ce facteur joue un rôle dans la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie.

Le but de ce mémoire sera donc d'investiguer le rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection contre l'apoptose induite par l'étoposide observée en hypoxie dans les cellules HepG2. L'étoposide est une molécule utilisée cliniquement en chimiothérapie. C'est un inhibiteur de la topo-isomérase II. Cette enzyme a pour fonction de désenrouler l'ADN: elle coupe les deux brins, les intervertit, et puis les religie. L'étoposide inhibe l'activité ligase et induit de ce fait des cassures double brin dans l'ADN. Ces cassures conduisent à l'activation de p53 et à l'apoptose des cellules.

Notre étude se divise en deux étapes.

La première consiste en la mise au point d'un système d'inhibition efficace et spécifique du facteur HIF-1. Pour cela, nous avons utilisé deux approches : un inhibiteur chimique de HIF-1 capable d'inhiber la liaison du facteur à l'ADN: l'échinomycine, et des si-RNA anti HIF-1 α . Nous avons examiné l'efficacité de chacune de ces approches de diverses manières et mis au point les conditions d'utilisation les plus appropriées. La spécificité de l'échinomycine a

également été étudiée. A partir des résultats obtenus, nous avons choisi d' utiliser les siRNA anti HIF-1 α pour la suite du travail.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié le rôle proprement dit du facteur de transcription HIF-1 dans la protection contre l' apoptose apportée par l' hypoxie. Pour ce faire, nous avons suivi la réponse de cellules dont le facteur HIF-1 est inhibé, à une incubation en présence d' étoposide en normoxie et en hypoxie. Nous avons utilisé deux approches pour mettre en évidence des protéines ou activités enzymatiques propres au processus d' apoptose que sont l' activité caspase et le clivage de PARP. Ainsi, si HIF-1 est impliqué dans la protection, son inhibition dans des cellules incubées sous hypoxie en présence d' étoposide devrait conduire à une activité caspase 3 et un clivage de PARP accrus par rapport à ceux dont le facteur HIF-1 est fonctionnel. Dans un second temps, le profil d' expression de 123 gènes dont les produits sont impliqués dans le processus apoptotique a été établi à l' aide de micro damier à ADN pour les différentes conditions expérimentales. L' utilisation de ces damiers devrait fournir des informations supplémentaires quant aux acteurs impliqués dans cette protection.

L' ensemble de ces résultats nous permettront de définir le rôle joué par le facteur de transcription HIF-1 dans la modulation de l' apoptose induite par l' étoposide lors de conditions d' hypoxie. Ils nous permettront ainsi de mieux comprendre comment les cellules résistent aux chimiothérapies in vivo.

Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Les types cellulaires utilisés

Les cellules utilisées durant ce mémoire seront majoritairement des cellules provenant d'une lignée d'hépatome humain appelées HepG2. Dans le cadre de certaines expériences et pour des raisons pratiques, un autre type cellulaire sera utilisé. C'est le cas pour les tests de mesure de liaison à l'ADN (transAM) nécessitant des extraits nucléaires de qualité, riches en protéines, pour lesquels des cellules issues de lignées de cancer de col utérin humain seront utilisées. Ces cellules se nomment HeLa.

1.2. Le repiquage des cellules HepG2

1.2.1. Matériel

- Milieu de culture complet :
 - Milieu DMEM 1g/l de glucose (Gibco, UK)
 - 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
 - Antibiotiques : - Pénicilline (50 U/ml) (BioWhittaker Europe, Belgique)
- Streptomycine (50 µg/ml) (BioWhittaker Europe, Belgique)
- Trypsine-EDTA : solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck (Gibco, UK)
- Boîtes de culture de 75 cm² (T75) (Costar, Corning, USA)
- Milieu de rinçage, PBS stérile (Phosphate Buffer Saline : 0,9 % NaCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)

1.2.2. Méthode

Les HepG2 sont cultivées en T75 placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. Les cellules sont repiquées sous hotte tous les deux jours selon le protocole suivant :

Le milieu de culture est décanté à la pipette pasteur. Les cellules sont ensuite rincées avec 5 ml de PBS. Les cellules sont détachées par un ajout de 2 ml de trypsine + EDTA suivi d'une incubation de 2 minutes à 37°C. Pour arrêter la réaction, 5 ml de milieu complet (DMEM +10% sérum + antibiotiques) sont ajoutés. La boîte contient alors 7 ml de suspension cellulaire. L'intégralité de cette suspension est transférée dans un tube de 10 ml. Celui-ci est centrifugé à 1000 rpm durant 4 minutes, faisant ainsi culotter les cellules. Les 7 ml de surnageant sont soigneusement décantés et le culot est resuspendu dans du milieu complet. La suspension cellulaire est ensuite répartie dans de nouvelles boîtes et le volume de chaque boîte est porté à 15 ml.

1.3. Le repiquage des cellules HeLa

La manière de procéder est identique à celle mise en œuvre pour les HepG2, si ce n'est que le milieu de culture est du α -MEM (Invitrogen) supplémenté de 10% de sérum.

Solutions	Composition
PBS	<ul style="list-style-type: none"> - 9 g de NaCl (Merck, Germany) - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M - Mise à volume avec H₂O distillée
PBS BSA 2%	<ul style="list-style-type: none"> - 100 ml de PBS - 2 g de BSA (Bovine Serum Albumine) (PAA Laboratories, Germany)
PBS Triton X-100 1%	<ul style="list-style-type: none"> - 100 ml de PBS - 1 g de Triton X-100 (T-9284, Sigma, USA)

Tableau 1 : Solutions utilisées pour le marquage en immunofluorescence.

2. Incubation sous hypoxie

2.1. Matériel

- Milieu CO₂ indépendant (Gibco, UK)
- L-glutamine (36 mg/500 ml) (Sigma, USA)
- Antibiotiques :
 - Pénicilline (50 U/ml) (Bio Whittaker Europe, Belgium)
 - Streptomycine (50 µg/ml) (Bio Whittaker Europe, Belgium)
- Echinomycine (Sigma, USA), concentration stock de 5 mM dans du DMSO
- Etoposide (Merck, Germany), concentration stock de 50 mM dans du DMSO

2.2. Méthode

Le milieu des cellules est décanté et remplacé par du milieu CO₂ indépendant (+ antibiotiques + L-glutamine). Pour les situations où cela est nécessaire, de l' étoposide à raison de 50 µM est ajouté dans le milieu. Lorsque de l' echinomycine est ajoutée, elle l' est à de très faibles concentrations (1, 2, 5, 10 nM) qui sont obtenues par des dilutions sériées dans du milieu CO₂ indépendant à partir de la solution stock de 5 mM. Le bouchon des boîtes ou le couvercle des plaques devant être hypoxiés est enlevé et celles-ci sont placées dans l' incubateur préalablement nettoyé à l' alcool. L' air y est ensuite chassé par de l' azote pur sous pression pendant 2 à 3 minutes de manière à ce que l' atmosphère de l' incubateur ne contienne plus que 1% d' oxygène. En fonction des conditions, l' hypoxie se poursuivra pendant 5 (western et immunofluorescence) ou 16 (extraction d'ARN et système rapporteur) heures.

3. Marquage en immunofluorescence

3.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique qui permet de visualiser et de localiser une protéine particulière au sein d' une cellule. Cette technique qualitative nécessite une fixation et une perméabilisation des cellules de manière à en rendre chacun des constituants accessibles. Elle utilise ensuite un anticorps primaire comme moyen de reconnaissance de la ou les protéine(s) d' intérêt(s). L' anticorps primaire pourra par après être reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Ce fluorochrome permettra par utilisation du microscope confocal de traduire l' abondance et la localisation de la ou les protéine(s) d' intérêt.

3.2. Matériel

- Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Germany)
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Germany)
- Solutions (Tableau 1)
- PBS + paraformaldéhyde 4% (Merck, Germany)
- Anticorps primaire: anti HIF-1α de souris (BD Bioscience, USA) dilué 100 x dans PBS BSA 2%

- Anticorps secondaire : anti-souris de chèvre couplé à l' Alexa 488 (MP 11001, Molecular Probe, USA)
- TO-PRO-3 (Molecular Probes, USA)
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Germany-UK)
- Microscope confocal (Leica, Germany)

3.3. Méthode

3.3.1. Repiquage en plaque multipuits

Au fond de chaque puits de plaque multipuits est déposé une lamelle couvre-objet préalablement stérilisée par trempage dans de l' alcool éther (éthanol 97%, éther 3%) (Belgalco, Belgium), puis séchée sur un papier torche stérile (stérilisé à l' alcool et séché sous hotte). Les cellules HepG2 sont ensuite repiquées à 50 000 ou 100 000 cellules par puits dans 1 ml de milieu complet. 24 heures après le repiquage, les cellules sont mises en présence d' échinomycine ou transfectées siRNA puis incubées en hypoxie ou normoxie pendant 5h.

3.3.2. Marquage

L' incubation terminée, le milieu est délicatement décanté et immédiatement remplacé par 500 μ l de PFA (paraformaldéhyde) 4% dans laquelle les cellules demeureront pendant précisément 10 minutes. S' ensuivent trois brefs rinçages au PBS ainsi qu' une perméabilisation au PBS Triton 1% (500 μ l) pendant 5 minutes. Les cellules fixées et perméabilisées sont rincées par trois lavages d' au moins cinq minutes chacun dans 1 ml de PBS BSA 2%. Ces rinçages, en plus d' enlever les éventuelles traces de PFA et de Triton pouvant interférer avec les étapes ultérieures, permettent grâce à la BSA de saturer les sites de liaison non spécifiques.

Pour une lamelle, 30 μ l d' anticorps primaire dilué 100 x dans du PBS BSA 2% sont déposés sur un morceau de parafilm placé en chambre humide. Les lamelles sont ensuite sorties de la plaque 24 puits et retournées sur la goutte. La chambre humide est scellée avec du parafilm, et placée en chambre froide pour la nuit. Le lendemain, les lamelles couvre-objets sont remises dans les puits (cellules vers le haut) pour y subir trois rinçages consécutifs au PBS BSA 2%. Suite à ces rinçages, le parafilm de la chambre humide est remplacé, et une goutte de 30 μ l d' anticorps secondaire dilué 500 x dans du PBS BSA 2% y est déposé par lamelle. S' ensuit une incubation d' une heure à température ambiante et à l' abri de la lumière de manière à préserver le fluorochrome couplé à l' anticorps secondaire. L' heure écoulée, les lamelle sont de nouveau transférées dans la plaque multipuits pour y être lavées trois fois au PBS. Après les lavages, elles vont de nouveau être mises en chambre humide sur un parafilm neuf pour une incubation de 30 minutes à l' obscurité en présence de 30 μ l de TO-PRO-3 dilué 80 x dans une solution de RNase (2 mg/ml de PBS). Cette étape va permettre le marquage des noyaux. Suite à cette dernière incubation, les lamelles sont de nouveau lavées 3 x dans du PBS puis montée sur lame porte-objet avec du Mowiol préchauffé à 57°C. Celui-ci est un milieu de montage préservant la fluorescence. Les lames porte-objets sont ensuite mises une nuit à 4°C avant d' être observées au microscope confocal en maintenant le PhotoMultiPlicateur (PMT) constant.

Tampon de lyse 2 x
TRIS 40 mM pH 7,5 (Merck, Germany)
KCl 150 mM (Merck, Germany)
EDTA 1 mM (Merck, Germany)

Tableau 2 : Composition du tampon de lyse 2 x.

PIB 25 x
NaVO ₃ 25 mM (Sigma, USA)
PNPP (Para-Nitrophényl Phosphate) 250 mM (Sigma, USA)
α -glycérophosphate 250 mM (Sigma, USA)
NaF 125 mM (Merck, Germany)

Tableau 3 : Composition du PIB 25 x.

Bleu de charge 5 x	
Tris HCl pH 6,8	1M
SDS (ICN Biomedicals, USA)	20%
β -mercaptoéthanol(Flukachemie AG, Suisse)	4%
Glycérol (Merck, Germany)	20%
Bleu de bromophénol (Janssens Chimica, Belgium)	1%

Tableau 4 : Composition du bleu de charge concentré 5 x.

Gel buffer	200 ml pH 8,9
TRIS (ICN Biomedicals, USA)	36,3 g
SDS (ICN Biomedicals, USA)	0,8 g

Tableau 5 : Composition du gel buffer.

Gel mix (35 ml)	10 %
Gel buffer	8,4 ml
Acryl/Bis (30/0,8) (Bio-Rad, USA)	11,6 ml
H ₂ O	15 ml

Tableau 6 : Composition du gel mix.

Gel séparateur	Pour 1 gel
Gel mix	35 ml
APS 25% (Pharmacia Biotech AB, Swedish)	175 μ l
TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)	10,5 μ l

Tableau 7 : Composition du gel séparateur

Spacer gel buffer	100 ml pH 6,8
TRIS (ICN Biomedicals, USA)	5,1 g
SDS (ICN Biomedicals, USA)	0,4 g

Tableau 8 : Composition du spacer gel buffer.

Spacer gel mix	24 ml
Spacer gel buffer	6 ml
Acryl/Bis (30/0,8) (Bio-Rad, USA)	4 ml
H ₂ O	14 ml

Tableau 9 : Composition du spacer gel mix.

Spacer gel	Pour 1 gel
Spacer gel mix	10 ml
APS 25 % (Pharmacia Biotech AB, Swedish)	50 µl
TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)	3 µl

Tableau 10 : Composition du spacer gel.

Running buffer 10 x	Pour 1L
TRIS (ICN Biomedicals, USA)	63,2 g
Glycine (ICN Biomedicals, USA)	40 g
SDS (ICN Biomedicals, USA)	10 g

Tableau 11 : Composition du tampon d' électrophorèse.

Tampon de transfert	5 litres
TRIS	24 g
Glycine	115 g
Méthanol	1 litre
H ₂ O	Mise à volume

Tableau 12 : Composition du tampon de transfert.

4. Western blot

4.1. Principe

Le western blot est une technique permettant d'estimer de manière semi quantitative les variations d'abondance d'une protéine entre différentes conditions expérimentales. Cette technique se déroule en plusieurs étapes. Des extraits protéiques totaux sont réalisés pour les différentes conditions d'intérêt, et sont ensuite chargés sur gel de polyacrylamide de manière à ce que la concentration protéique soit la même pour chaque condition. Ils sont ensuite soumis à une électrophorèse de manière à séparer les protéines selon leur taille, et une fois celle-ci terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF. Sur la membrane, les protéines sont accessibles et peuvent être marquées par un anticorps primaire. Celui-ci pourra ensuite être reconnu par un anticorps secondaire couplé à un système de révélation permettant d'imprimer un film photographique.

4.2. Extraits protéiques totaux

4.2.1. Matériel

- Tampon de lyse 1 x (2 ml)
 - 1 ml de tampon de lyse (2 x) (Tableau 2)
 - 20 µl de Triton X-100 (Sigma, USA)
 - 200 µl d'inhibiteurs de protéases 1x (à partir de Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets 25 x ou PIC) (Roche, Germany)
 - 200 µl d'inhibiteurs de phosphatases 1 x (à partir de Complete Phosphatases Inhibitor Buffer 25 x ou PIB) (Tableau 3)
 - 580 µl d'H₂O

4.2.2. Méthode

Les cellules sont dans ce cas-ci cultivées en T25 (Costar, Corning, USA). Après l'incubation, les T25 sont placées sur glace, et le milieu est décanté. Les cellules sont raclées dans 150 µl de tampon de lyse 1 x, et le lysat est transféré dans un eppendorf sur glace. Celui-ci est ensuite centrifugé à 13 000 rpm à 4°C pendant 5 minutes de manière à culotter les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite récupéré et stocké à -80°C.

4.3. Préparation des échantillons

Un volume de lysat correspondant à 40 µg de protéines est prélevé et porté à un volume de 40 µl avec de l'eau distillée. 10 µl de bleu de charge (Tableau 4) sont ajoutés, et les échantillons sont dénaturés pendant 10 minutes à 70°C.

4.4. Electrophorèse

4.4.1. Matériel

- Gel séparateur (Running gel) (Tableaux 5, 6 et 7)
- Gel concentrateur (Stacking gel) (Tableaux 8, 9 et 10)
- Tampon d'électrophorèse (Running buffer) (Tableau 11)

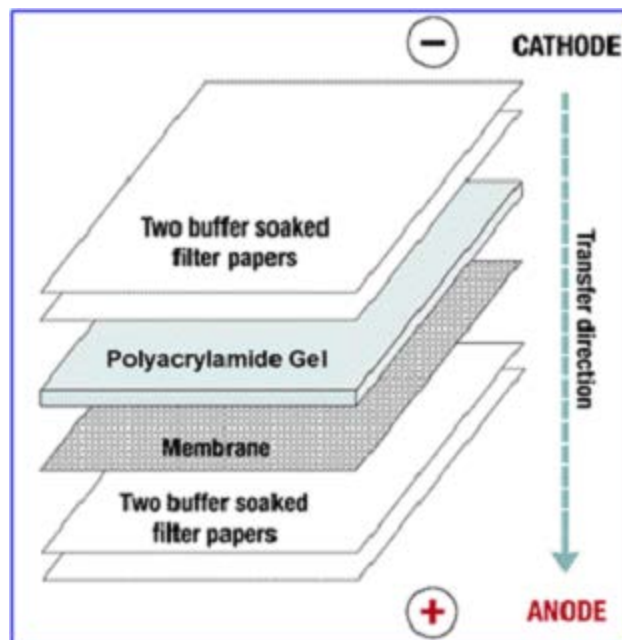


Figure 1 : Montage en sandwich du gel d' électrophorèse et de la membrane de transfert.

TBS-Tween 0,1%	Pour 1L
NaCl (Merck, Germany)	2,42 g
Tris (Merck, Germany)	8 g
Tween (Sigma, USA)	1 ml

Tableau 13 : Composition du TBS-T.

<u>Anticorps primaires</u>	
Anticorps	Dilution
HIF-1 α : mouse anti HIF-1 α (610958, BD Bioscience)	1500 x
PARP : rabbit anti human PARP p85 fragment (G7341, Promega)	5000 x
Caspase 3 : rabbit anti caspase 3 (Cell signaling # 9662)	5000 x
α -tubuline : mouse anti α -tubuline (T5168, Sigma)	60 000 x
<u>Anticorps secondaires</u>	
Anticorps	Dilution
Anti IgG de souris couplé à une peroxydase (Amersham)	150 000 x
Anti IgG de lapin couplé à une peroxydase (Amersham)	100 000 x

Tableau 14 : Anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la révélation du western blot.

4.4.2. Méthode

Les plaques sont montées et le gel concentrateur est coulé de manière à ce que son niveau soit un centimètre sous le peigne. De l' isobutanol saturé en eau est alors déposé à la surface du gel fraîchement coulé de façon à l' aplanir et l' en préserver de l' oxygène (interférant avec la polymérisation), ainsi que de la déshydratation. Après une heure, la polymérisation est terminée, l' isobutanol peut être enlevé et la surface du gel soigneusement rincée puis séchée à l' aide d' un papier Whatman. Le gel concentrateur est ensuite coulé jusqu' à rasbord et le peigne placé en évitant les bulles. S' ensuivent 45 minutes de polymérisation au terme desquelles le peigne est enlevé. Le gel est placé dans la cuve, les échantillons sont chargés et migrent ensuite pendant 30 minutes à 30 mA à travers le gel concentrateur puis 3 heures à 45 mA à travers le gel séparateur.

4.5. Transfert (Blotting)

4.5.1. Matériel

- Appareil de transfert : Hoeffer Semiphor (Amersham, USA)
- Papier Whatman (Merck, Germany)
- Membrane de PVDF (Amersham, UK)
- Tampon de transfert (Tableau 12)

4.5.2. Méthode

Après la migration, le gel est démoulé, et la membrane est activée et hydratée dans du méthanol 100% pendant 1 minute, puis équilibrée durant 5 minutes dans du tampon de transfert. Après avoir été équilibrés, la membrane et le gel sont assemblés en sandwich (Figure 1) dans la cuve de transfert. Tous les composants sont humectés avec du tampon de transfert et assemblés sans qu' aucune bulle ne s' immisce entre les différents constituants du sandwich. Le transfert va ensuite s' effectuer durant 2 heures à 150 mA.

4.6. Saturation et révélation

4.6.1. Matériel

- Tampon de rinçage : TBS-Tween 0,1%, pH 7,6 (TBS-T) (Tableau 13)
- Anticorps primaires et secondaires (Tableau 14)
- Agent bloquant (Amersham, UK)
- Substrat de révélation: ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, UK)
- Film photographique (Amersham, UK)
- Solutions de révélation et de fixation (Ilford 2000RT Imaging, USA)

4.6.2. Méthode

Suite au transfert, la membrane est démoulée du sandwich et est saturée dans du TBS-Tween 0,1% contenant 2% d' agent bloquant pendant 2 heures à température ambiante. Elle est ensuite incubée 2 heures à température ambiante en présence de l' anticorps primaire dans un biberon contenant 15 ml de TBS-T 0,1% + agent bloquant 2%. Après l' incubation, la membrane est lavée trois fois durant 15 minutes dans du TBS-T 0,1% , avant d' être incubée 1

Solutions	Réactifs
HB 10 x (Hypotonic buffer)	<ul style="list-style-type: none"> - 200 mM HEPES (Acro Organics) - 50 mM NaF (Merck, Germany) - 10 mM Na₂MoO₄ (Sigma, Germany) - 1 mM EDTA (Merck, Germany) - pH 7,9
Tampon de lyse (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 ml de HB 10 x - 200 µl Nonidet P-40 (Sigma, USA) - 89,8 ml de H₂O
Tampon de resuspension (RE) (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 ml de HB 10 x - 20 ml de glycérol 87% - 70 ml de H₂O
Tampon salin (SA) (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 ml HB 10 x - 20 ml de glycérol 87% - 20 ml de NaCl 4 M (7,01 g/30 ml H₂O) - 50 ml de H₂O
RE complet (1 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 1 ml de RE - 40 µl de PIC - 40 µl de PIB
SA complet (1 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 1 ml de SA - 40 µl de PIC - 40 µl de PIB
PBS froid + inhibiteurs de phosphatases (30 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 30 ml de PBS 10 mM 150 mM NaCl - 7,2 mg de Na₂MoO₄ - 1,26 mg de NaF

Tableau 15 : Solutions utilisées lors de l' extraction nucléaire.

heure en présence de l' anticorps secondaire. Elle est ensuite lavée 3x 20minutes dans du TBS-T 0,1%. La membrane peut ensuite être mise au contact de la solution de révélation pendant 5 minutes avant d' impressionner un film photographique en chambre noire. Le film est ensuite plongé dans le révélateur, rincé à l' eau, fixé 4 minutes dans le fixateur, et enfin lavé une dernière fois à l' eau.

5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le but de cette méthode est d' estimer la quantité de protéines présente dans un échantillon. De 2 à 5 µl d' extraits protéiques sont ajoutés de 30 secondes en 30 secondes dans 1 ml de réactif de Bradford dilué 5 x et filtré (Colorant Bio-Rad protein Assay 5 x, Bio-Rad, USA). 5 minutes après l' ajout de l' extrait, la D.O. est mesurée à 595 nm à l' aide d' un spectrophotomètre préalablement mis à zéro avec de l' eau. La D.O. à cette longueur d' onde est proportionnelle à la concentration en protéines, et elle doit être normalisée à l' aide de différents contrôles. Le blanc échantillon correspond au tampon de lyse avec lequel les extraits ont été réalisés. L' étalon est constitué de BSA (Bovine Serum Albumine de concentration connue : 2µg/µl). Le blanc étalon est constitué d' eau. Chaque mesure est effectuée en duplicat. La concentration en protéines est ensuite calculée à partir des différentes D.O. en utilisant la formule suivante.

$$\frac{((\text{moyenne test} - \text{moyenne blanc test})/(\text{moyenne étalon} - \text{moyenne blanc étalon})) \times 5}{\text{volume des échantillons}} = \mu\text{g de protéines}/\mu\text{l}$$

6. Mesure de la liaison à l' ADN (TransAM)

6.1. Principe

Le but de cette méthode colorimétrique est de mesurer la liaison à l' ADN de facteurs de transcription. Celle-ci utilise des puits au format de plaque 96 puits coatés à la streptavidine. On peut piéger au fond de ces puits un trappeur, qui est un ADN double brin biotinylé à une extrémité et portant la séquence consensus du facteur de transcription dont on veut mesurer la liaison (HIF-1, AP-1, c-Myc). Une fois le trappeur fixé, on incube des extraits nucléaires et si le facteur d' intérêt est présent et actif il sera, par sa liaison au trappeur, piégé au fond du puits. L' éventuelle présence du facteur est ensuite détectée par un anticorps primaire spécifique de celui-ci qui sera à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase de raifort (HRP). L' activité enzymatique de cette dernière permet une réaction colorimétrique par laquelle on peut estimer la quantité de facteur présent et actif dans les extraits nucléaires.

6.2. Matériel

6.2.1. L' extraction nucléaire

- Solutions : (Tableau 15)
- Na₂MoO₄ (Sigma, Germany)
- NaF (Merck, Germany)
- Glycérol 87 % (Merck, Germany)
- PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Germany)
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) (Roche, Germany)

Solutions	Trans-AM HIF-1α	Trans-AM AP1	Trans-AM c-myc
Tampon de binding	<u>Tampon de binding 5 x</u> - Tris HCl 50 mM - EDTA 5 mM - NaCl 250 mM - Glycérol 25% - Mise à volume: H ₂ O - pH 7,8 <u>Tampon de binding complet 1 x :</u> - 1 ml de tampon 5 x - 2,5 μ l de DTT 1 M - 3 ml de H ₂ O	<u>Tampon de binding 3 x</u> - HEPES 6 mM pH 7,9 - EDTA 0,6 mM - NaCl 24 mM - Glycérol 36% - Mise à volume: H ₂ O - pH 7,9 <u>Tampon de binding complet 1 x :</u> - 800 μ l de tampon de binding 3 x - 240 μ l de DTT 10 mM - 8 μ l de PolydIC 0,05 μ g/ μ l - 24 μ l de gloria 10% - 1352 μ l de H ₂ O	<u>Tampon de binding 1 x</u> - HEPES 2 mM - EDTA 0,2 mM - NaCl 8 mM - Glycérol 12% - Mise à volume : H ₂ O - pH 7,5 <u>Tampon de binding complet 1 x</u> - 1 ml de tampon 1 x - 5 μ l de DTT 1 M
Tampon de lyse	- 1 ml de RE - 1 ml de SA - 2 μ l de DTT 1 M - 80 μ l de PIB - 80 μ l de PIC	- 1 ml de RE - 1 ml de SA - 2 μ l de DTT 1 M - 80 μ l de PIB - 80 μ l de PIC	- 1 ml de RE - 1 ml de SA - 80 μ l de PIB - 80 μ l de PIC
Lysat	Lysat dilué dans le tampon de lyse à une concentration de 5 μ g/10 μ l	Lysat dilué dans le tampon de lyse à une concentration de 5 μ g/20 μ l	Lysat dilué dans le tampon de lyse à une concentration de 10 μ g/10 μ l
Solution de rinçage	Pour 200 ml - 200 ml de PBS 50 - 200 μ l de Tween 20 (0,1%) - 200 mg de BSA (0,1%)	Pour 200 ml - 200 ml de PBS 50 - 200 μ l de Tween 20 (0,1%)	Pour 200 ml - 200 ml de PBS 50 - 200 μ l de Tween 20 (0,1%)
Anticorps primaire	- Anticorps de souris anti HIF-1 α BD 610958 Bioscience (250 μ g/ml) 1 - Dilué 1000 x dans du PBS 50 BSA 1%	- Anticorps de lapin anti c- fos Santa Cruz 7202 (200 μ g/ml), - Dilué 1000 x dans du PBS 50 BSA 1%	- Anticorps de souris Santa Cruz 42 anti c-myc - Dilué 500 x dans du PBS 50 BSA 1%
Anticorps secondaire	- Anticorps de chèvre anti souris couplé à HRP Santa Cruz 2055 (200 μ g/0,5 ml) - Dilué 1000 x dans PBS 50 Gloria 1%	- Anticorps de chèvre anti lapin couplé à HRP Santa Cruz 2004 (200 μ g/0,5 ml) - Dilué 1000 x dans PBS 50 BSA 1%	- Anticorps de chèvre anti souris couplé à HRP Santa Cruz 2055 (200 μ g/0,5 ml) - Dilué 1000 x dans PBS 50 Gloria 1%
PBS 50	Pour 1 litre - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M - 2,922 g de NaCl - pH 7,5	Pour 1 litre - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M - 2,922 g de NaCl - pH 7,5	Pour 1 litre - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M - 2,922 g de NaCl - pH 7,5

Tableau 16 : Solutions utilisées lors du dosage colorimétrique.

6.2.2. Le dosage colorimétrique

- Solutions (Tableau 16)
- Plaque 96 puits coatée avec les trappeurs ayant la séquence de liaison pour HIF-1, AP1, c-myc
- Pipette multichannel avec tips biohit (Finlande)
- Spectrophotomètre (Ultramarck Microplate Imaging System, Bio-Rad)

6.3. Méthode

6.3.1. L' extraction nucléaire

Toutes les opérations ont lieu sur glace et les solutions utilisées sont maintenues à 4°C. Le milieu de culture est soigneusement décanté des boîtes qui sont ensuite rincées avec 5 ml de PBS froid + Na₂MoO₄ et NaF sur glace. Le milieu de rinçage est décanté et 10 ml de tampon hypotonique (HB) sont ensuite ajoutés pour 3 minutes précisément (ce temps doit être respecté pour ne pas endommager les noyaux à cette étape de l' extraction). Ce tampon va faire gonfler les membranes plasmique sans les faire éclater. Après les 3 minutes, le HB est décanté et les cellules sont raclées dans 500 µl de tampon de lyse. Le « lysat » cellulaire est transféré dans un eppendorf sur glace qui sera ensuite centrifugé à 13 000 rpm pendant 30 secondes. Cette opération a pour but de faire sédimenter le noyau des cellules lysées. Le surnageant est ensuite décanté, et le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 50 µl de RE auxquels sont ensuite ajoutés 50 µl de SA. Les 100 µl contenant les noyaux sont bien homogénéisés avant d' être placés sur roue pendant 30 minutes à 4°C. Cette opération permet d' extraire le contenu protéique des noyaux. Les eppendorfs sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C et le surnageant est aliquoté puis stocké à – 70°C.

6.3.2. Le dosage colorimétrique

40 µl (pour HIF-1 et AP-1) ou 30 µl (pour c-myc) de tampon de binding 1 x sont déposés dans chaque puits. Une quantité de lysat additionnée de tampon de lyse nécessaire à porter le volume de chaque puits à 50 µl est ajoutée. En fonction du facteur cette quantité contiendra 5 ou 10 µg de protéines (Tableau 16). La solution contenue dans chaque puits offre des conditions propices à la liaison du facteur d' intérêt sur son trappeur. L' incubation dure une heure à température ambiante sous une légère agitation. L' heure écoulée, les puits sont vidés et lavés trois fois avec 200 µl de solution de rinçage approprié (Tableau 16). Dans chaque puits sont ensuite ajoutés 100 µl d' anticorps primaire destinés à reconnaître le facteur de transcription (Tableau 16). L' incubation qui s' ensuit dure une heure à température ambiante sans agitation. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec 200 µl de solution de rinçage appropriée avant d' être remplis avec 100 µl d' anticorps secondaire couplé à une peroxydase (Tableau 16). L' incubation est identique à celle de l' anticorps primaire. L' incubation terminée, les puits sont lavés quatre fois avec 200 µl de solution de rinçage.

La révélation peut avoir lieu. 100 µl de TMB (Tétra Méthyl Benzidine, Biosource) sont ajoutés à chaque puits. Suite à une incubation dans l' obscurité allant de 5 à 10 minute en fonction du facteur, 100 µl de solution stop (Biosource) sont ajoutés. La densité optique est ensuite mesurée à 450 nm (référence à 655 nm).

Tube 1		Tube 2	
Si-RNA	Opti-MEM	Dharmafect	Opti-MEM
Si-RNA à concentration voulue dilués dans un volume d' OptiMEM équivalent à 1/10 du volume transfectant final		Dharmafect dilué 250 x par rapport au volume de transfection final dans un volume d' OptiMEM équivalent à 1/10 du volume transfectant final	
Mixer délicatement à la pipette et attendre 5 minutes		Mixer délicatement à la pipette et attendre 5 minutes	
Contenu du tube 1 transvasé dans le tube 2, mixage délicat à la pipette et 20 minutes d' attente (formation des complexes).			
Mise au volume final avec du DMEM + sérum sans antibiotiques			

Tableau 17 : Protocole à suivre pour réaliser le mix de transfection avec les si-RNA.

<u>Réceptient</u>	<u>Tube 1</u>		<u>Tube 2</u>		<u>Milieu complet sans AB</u>	<u>Volume de transfection final</u>
	Si-RNA : solution 2 μ M	Opti-MEM	Dharmafect	Opti-MEM		
Puits de plaque 24 puits	5 μ l	45 μ l	2 μ l	48 μ l	400 μ l	500 μ l
Puits de plaque 6 puits	15 μ l	135 μ l	6 μ l	144 μ l	1,2 ml	1,5 ml
T25	40 μ l	360 μ l	16 μ l	384 μ l	3,2 ml	4 ml
T75	80 μ l	720 μ l	32 μ l	768 μ l	6,4 ml	8 ml

Tableau 18 : Détail du mix de transfection pour divers types de boîtes de culture avec une concentration finale en si-RNA de 20 nM.

7. Transfection avec des si-RNA

7.1. Matériel

- Smart pool de si-RNA anti HIF-1 α (cat :M-004018-02) (Dharmacon, USA)
- Non targeting RNA (cat :D-001210-01)
- Dharmafect N°1 Transfection Reagent (Dharmacon, T-2001-02, USA)
- Opti-MEM (Gibco, UK)

7.2. Méthode

Pour une transfection optimale, les cellules doivent être à une confluence de l'ordre de 50 000 cellules par cm², elles sont donc repiquées à cette confluence 24 heures avant la transfection. Le mix de transfection est préparé (Tableaux 17 et 18), l'ancien milieu est décanté, et les cellules sont incubées 24 heures en présence du milieu de transfection. A la suite de cette incubation, le milieu de transfection est décanté et remplacé par du milieu complet.

8. Système rapporteur

8.1. Principe

Les systèmes rapporteurs permettent de rendre compte de l'activité d'un facteur de transcription au sein d'une cellule. Un plasmide encodant une enzyme dont l'activité est aisément mesurable (la luciférase) est transfecté. Le gène codant pour l'enzyme porté par ce plasmide est sous le contrôle d'un promoteur reconnu par le facteur dont on veut mesurer l'activité. Ce plasmide est transfecté conjointement à un autre plasmide dit « de normalisation » (pCMV- β -gal). Ce dernier encode une β -galactosidase sous contrôle d'un promoteur fort induisant une expression constitutive, le promoteur CMV. Le rôle de ce plasmide est de permettre de rapporter l'activité luciférase à l'efficacité de transfection et au nombre de cellules. Cela se fera par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde caractéristique d'un substrat artificiel clivé par la β -galactosidase.

8.2. Matériel

- Superfect (Qiagen, USA)
- Plasmides (Tableau 19)
- Milieu de rinçage, PBS stérile (phosphate buffer saline : 0,9% NaCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- DMEM (Gibco, UK)
- PLB (passive lysis buffer) (Promega, USA)
- Substrat β -gal (Tableau 20)
- Luciferase Assay Substrate (Promega, USA)

8.3. Méthode

Le mix de transfection doit contenir les deux plasmides dans les proportions suivantes : plasmide rapporteur, 8/13, plasmide de normalisation, 5/13. Après 10 minutes, les complexes sont formés et le milieu de transfection est porté à volume avec du DMEM.

	Nom du plasmide	Nombre de sites consensus	Provenance
HIF-1	6 HRE pGL3-SV 40	6	Michel <i>et al.</i> , 2002
AP-1	pAP-1 - LUC	7	Stratagène
c-myc	pGL2-M4-Luciferase	4	James et Eisenman, 2002

Tableau 19 : Les différents plasmides rapporteurs utilisés.

Substrat β -galactosidase	50 ml
MgCl ₂ .6H ₂ O (Merck, Germany)	0,0203 g
ONPG (ACROS,)	66,5 mg
2-mercaptoéthanol (FLUKA, Germany)	350 μ l
Tampon PO ₄ stock 0,5M pH 7,4	2 ml
Mise à volume	H ₂ O

Tableau 20 : Composition du tampon de réaction de la β -galactosidase.

Pour 2 puits de plaque 24 puits	
Plasmide rapporteur	1,846 μ g
Plasmide de normalisation	1,154 μ g
PBS	Compléter de manière à obtenir 15 μ l
Superfect (Qiagen)	6 μ l
10 minutes d'attente: formation des complexes	
DMEM (Gibco, UK)	1 ml

Tableau 21 : Composition du mix transfectant utilisé lors de la transfection du système rapporteur.

Mix de réaction	Par tube
Buffer RT 5 x	4 μ l
RNasin (40U/ μ l)	1 μ l
DTT 0,1M	2 μ l
dNTP mix	2 μ l

Tableau 22 : Composition du mix de réaction utilisé lors de la rétro-transcription.

Les cellules à transfecter sont préalablement repiquées en plaque 24 puits, à une densité de 50000 cellules par puits. Au moment de la transfection, les puits sont décantés et 500 µl de milieu transfectant (Tableau 21) sont ajoutés pour une durée de 6 heures. Passé ce délai, le milieu de transfection est remplacé par du milieu CO₂ indépendant et les cellules sont incubées sous hypoxie pendant 16 heures.

Le lendemain s'opère la révélation. Le milieu est décanté et on ajoute à chaque puits 200µl de tampon de lyse. Les cellules sont agitées à RT pendant au moins cinq minutes de manière à obtenir une bonne homogénéisation du contenu cellulaire.

On procède d'abord à la révélation du système de normalisation. Du lysat de chaque puits, 50 µl sont prélevés, mis en plaque 96 puits, et additionnés de 50 µl de substrat β-gal. La réaction de révélation peut se poursuivre durant 2 heures, à 37°C dans l'obscurité. L'absorbance à 405 nm sera alors mesurée. Pendant ce temps, on procède à la révélation de l'activité luciférase. Un minitube est préparé pour chaque condition et est rempli de 60 µl de solution de révélation. Ensuite, juste avant la mesure, 10 µl de lysat y sont ajoutés, le mélange est agité, et la mesure de la luminescence est effectuée pendant 10 secondes. Les résultats s'expriment sous forme de rapport RLU/ Absorbance du produit de la réaction de la β-galactosidase.

9. L' extraction d' ARN total

9.1. Matériel

- Total RNA isolation kit (Promega, USA)
 - Denaturation solution
 - Sodium acetate 2M
 - Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (125: 24:1, pH 4,7)
 - Nuclease free water
 - Isopropanol
- Ethanol à 75% dans de l' eau RNase free
 - Ethanol (Merck, Germany)
 - Eau traitée au DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate) (ACROS, USA)

9.2. Méthode

Toutes les manipulations avec de l' ARN se font en condition RNase free. La paillasse est couverte d' une feuille d' aluminium et tout le matériel utilisé (tips, eppendorfs..) ne doit jamais avoir été en contact avec des mains non gantées. Les pipettes, boîtes de tips et tout ce qui est susceptible d' entrer en contact avec les échantillons sont passés au SDS 1%. Les mains étant la principale source de contamination à la RNase, le port de gants est indispensable durant toutes les opérations.

Les boîtes de culture sont vidées et le milieu est soigneusement décanté. Les cellules sont mises sur glace et par T 75, 600 µl de solution de dénaturation sont ajoutés. Les cellules sont raclées dans la solution de dénaturation et le lysat cellulaire est transféré dans un eppendorf sur glace. 60 µl d' acétate de sodium sont ajoutés au lysat, et celui-ci est mélangé 4 à 5 fois par inversion. On y ajoute 600 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique et l' échantillon est vortexé jusqu'à homogénéisation de la solution qui est ensuite laissée 15 minutes sur glace. Les eppendorfs sont ensuite centrifugés 15 minutes à 10 000 g à 4°C et le surnageant aqueux de la phase supérieure contenant l' ARN est récupéré. Celui-ci est alors transféré dans un nouvel eppendorf à RT et on y ajoute 600 µl d' isopropanol avant d' incuber au minimum un quart d' heure à -20°C. Cette opération de précipitation de l' ARN terminée, la solution est centrifugée 10 minutes à 13 000 g et à 4°C. Après la centrifugation, le surnageant est décanté

et le culot d'ARN est lavé par redissolution dans 1 ml d'éthanol à 75%. La solution est de nouveau centrifugée 10 minutes à 13 000 g à 4°C et l'éthanol est décanté. Le culot est séché et resuspendu dans 25 µl d'eau RNase free. 2 µl de la resuspension sont prélevés pour le dosage et les 23 µl restants sont stockés à -80°C. Les 2 µl destinés au dosage sont resuspendus dans 98 µl d'eau RNase free et l'absorbance est mesurée à 260 nm dans une cuve en quartz. Une unité d'absorbance équivaut à 40 µg par ml. Si nécessaire, les échantillons sont analysés au bioanalyseur (Agilent 2100 Bioanalyser) de manière à s'assurer de l'intégrité de l'ARN.

10. La PCR en temps réel

10.1. Principe

La PCR en temps réel permet de mesurer les variations d'abondance de transcrits entre une condition contrôle et plusieurs conditions test. Après avoir réalisé des extraits d'ARN totaux, ceux-ci sont rétro-transcrits avec des amorces poly-T de manière à générer de l'ADNc pour chaque messenger. Cet ADNc va être amplifié par PCR et la quantité d'amplicons va être mesurée en fin de chaque cycle à l'aide de SYBR green, une molécule qui fluoresce après s'être intercalée dans de l'ADN double brin. A un cycle de PCR donné, la fluorescence est telle qu'elle se distingue du bruit de fond et provient de l'amplicon spécifiquement formé. Ce cycle s'appelle CT (Cycle Threshold). La valeur de ce cycle est inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ, et donc à la quantité de messenger dans l'échantillon. Cette valeur de cycle est normalisée à celle d'un gène dont la quantité est invariable, par exemple l' α -tubuline ou la TBP (TATA box Binding Protein). Pour s'assurer de la spécificité de l'amplification, une courbe de dissociation est réalisée en fin de PCR, elle correspond à une chute de fluorescence à une température donnée pour laquelle les brins d'ADN de l'amplicon se séparent.

10.2. La rétro-transcription

10.2.1. Matériel

- Oligo-dT (Invitrogen, USA)
- Superscript II (Reverse transcriptase, 200 U/µl) (Invitrogen, USA)
- RNaseH (2 U/µl) (Invitrogen, USA)
- Réaction mix (Tableau 22)

10.2.2. Méthode

Dans un eppendorf, 2 µg d'ARN sont dilués dans 7,5 µl d'eau RNase free auxquels sont ensuite ajoutés 2 µl d'oligo-dT. Le mix est incubé 10 minutes à 70°C puis mis sur glace pour une durée de 5 minutes. 9 µl de mix de réaction sont ensuite ajoutés et le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite 1,5 µl de Superscript II et les échantillons sont incubés 1h30 à 42°C. La transcriptase est ensuite dénaturée par une incubation de 15 minutes à 70°C. L'ARN messenger résiduel est ensuite dégradé par une incubation de 20 minutes à 37°C en présence de RNase H. Les échantillons d'ADNc sont ensuite stockés à -20°C.

Gènes	Séquences
GAPDH	Amorce sens 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGAC 3' Amorce antisens 5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'
Aldolase	Amorce sens 5' AATGTTCTGGCCCGTTATGC 3' Amorce antisens 5' GCACCTTCTCGGTCACATACGT 3'
α -tubuline	Amorce sens 5' CCCGAGGGCACTACACCAT 3' Amorce antisens 5' CAGGGAGGTGAACCCAGAAC 3'
Birc3	Amorce sens 5' GTCCCAGGCTGAGGCAAGA 3' Amorce antisens 5' TAAAGGCAGGGTCTCAGTATGCT 3'
p21	Amorce sens 5' CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA 3' Amorce antisens 5' CCAGGACTGCAGGCTTCCT 3'
HIF-1 α	Amorce sens 5' TCAAGCAGTAGGAATTGGAACATTATT 3' Amorce antisens 5' TTTACACGTTTCCAAGAAAGTGATGTA 3'
Bak	Amorce sens 5' CTTCGTGGTCGACTTCATGCT 3' Amorce antisens 5' GGACCATTGCCCAAGTTCAG 3'
Mcl-1	Amorce sens 5' AAACGGGACTGGCTAGTTAAACAA 3 Amorce antisens 5' TACTCCAGCAACACCTGCAAA 3'
TBP	Amorce sens 5' TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT 3' Amorce antisens 5' CCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGA 3'

Tableau 23 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

10.3. PCR en temps réel.

10.3.1. Matériel

- Master mix “SYBR Green PCR” (AppliedBiosystem, Holland)
- Amorce sens et antisens (Tableau 23)
- Plaque multipuits (96 well optical reaction plate, Applied Biosystem, Holland)
- 7000 sequence detection system (Applied Biosystem, Holland)

10.3.2. Méthode

Pour chaque gène dont la variation de messenger veut être mesurée, on réalise un mix contenant pour un puits : 12,5 µl de SYBR Green ; 2,5 µl d' amorce sens et antisens, et 2,5 µl d' eau distillée. 20 µl de ce mix ainsi que 5 µl d' ADNc dilué 100 x sont placés dans les puits, la plaque est couverte d' un film plastique autocollant, centrifugée à 600 rpm pendant 5 minutes, puis placée dans l' appareil. La PCR commence par une étape de dénaturation à 95°C qui dure 5 minutes. S' ensuivent alors 40 cycles comprenant 15 secondes de dénaturation à 95°C suivis d' une étape d' hybridation/élongation de 1 minute à 65°C. Le niveau d' induction par rapport à une condition contrôle se calcule comme suit. La valeur CT d' un gène donné pour une condition donnée est normalisée par rapport à la valeur CT du gène de référence correspondant (l' α -tubuline ou TBP), on obtient le ΔCT . On soustrait à celui-ci le ΔCT de la condition par rapport à laquelle on souhaite normaliser (dans notre cas la normoxie), on obtient alors une valeur appelée $\Delta\Delta CT$. En effectuant $2^{-\Delta\Delta CT}$ on obtient le niveau d' induction de ce gène par rapport à la condition de référence.

11. L' apoptochip

11.1. Principe

L' apoptochip est un damier reprenant des sondes permettant de détecter 123 gènes humains (en triplicats) dont les produits sont impliqués dans l' apoptose. Il permet de suivre l' expression de 123 messagers en comparaison avec une condition contrôle. Cette technique se déroule en trois étapes. Il faut d' abord réaliser une extraction d' ARN total pour les conditions d' intérêt. La pureté et l' intégrité de l' ARN obtenu doivent être estimés au bioanalyseur, car de l' ARN dégradé pourrait amener à des résultats biaisés et des interprétations erronées. Il faut ensuite rétro-transcrire l' ARNm en ADNc comprenant des cytosines biotinylées. Celles-ci vont servir pour la détection et la quantification des différents gènes repris sur le damier. Cette étape terminée, on peut enfin réaliser l' hybridation sur damier. Les lames seront ensuite scannées à l' aide d' un scanner laser puis analysées de manière à connaître les variations d' expression des 123 messagers entre les différentes conditions expérimentales. La liste des 123 gènes est reprise en annexe.

11.2. La rétrotranscription

11.2.1. Matériel

Tous les réactifs sont identiques à la RT classique. Ceux qui diffèrent sont signalés et/ou repris dans le tableau 24.

Mix dNTP 10 x	40 µl
dATP (100 mM)	2 µl
d TTP (100 mM)	2 µl
dGTP (100 mM)	2 µl
dCTP (16 mM)	2 µl
dCTP biotinylés (1 mM)	32 µl

Tableau 24 : Composition du mix de dNTP 10 x utilisé lors de la rétro-transcription précédant l'hybridation sur l'apoptochip.

Solutions	Composition
Tampon de lyse 2 x	- Hepes/KOH 10 mM pH 7 - EDTA 2 mM - CHAPS 0,1%
Tampon de lyse complet (1 ml)	- 500 µl de tampon de lyse 2 x - 0,1 g de saccharose - 5 µl de DTT 1M - 7 µl d'aprotinine - Mise à volume H ₂ O
Tampon de réaction 2 x	- PIPES 40 mM pH 7,2 - NaCl 200 mM - EDTA 2 mM - CHAPS 0,2%
Tampon de réaction complet (1 ml)	- 1 ml de tampon de réaction 2 x - 0,1 g de saccharose - 20 µl de DTT 1M - La dilution 2 x se fait au moment du dosage lorsqu'un volume de tampon de réaction est ajouté à un volume identique d'échantillon resuspendu dans du tampon de lyse

Tableau 25 : Composition des tampons utilisés pour le dosage de l'activité caspase 3.

11.2.2. Méthode

10 µg d'ARN sont dilués dans 5,5 µl d'HO RNase Free et 2 µl de standard interne (Eppendorf, Germany) ainsi que 2 µl d'oligo dT leur sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé 10 minutes à 70°C puis 5 minutes sur glace. 9 µl du mix de réaction (est identique à celui utilisé pour la rétro-transcription classique, seul le mix de dNTP 10 x diffère, sa composition est reprise dans le tableau 24) sont ensuite ajoutés, et le tout est alors incubé 5 minutes à température ambiante. S'ensuivent deux incubation consécutives d'1h30 à 42°C, chacune précédée d'un ajout de 1,5 µl de transcriptase inverse. Vient alors une incubation de 10 minutes à 70°C au terme de laquelle on ajoute 1 µl de RNase H avant d'incuber une seconde fois mais à 37°C et pendant 20 minutes. La RNase H est ensuite dénaturée par une incubation de 3 minutes à 95°C. Les échantillons sont prêts et peuvent être congelés à -20°C.

11.3. Hybridation

11.3.1. Matériel

- Cfr mode protocole Eppendorf

11.3.2. Méthode

L'hybridation sur le damier «DualChip Human Apoptosis » a été réalisée en suivant les instructions du manuel DualChipTM (Eppendorf). Les hybridations ont été réalisées à l'aide d'un Thermoblock pour lames DC avec un Thermomixer Comfort (Eppendorf) durant 16 heures à 60°C et 1400 rpm. Les lames ont été scannées à l'aide d'un scanner laser confocal (Scan Array 4000 XL, Perkin Elmer Life Sciences). Les résultats ont été quantifiés avec le logiciel « Silverquant Analysis » et analysés grâce au logiciel « Statistical Software 1.28 ».

12. Dosage de l'activité caspase 3

12.1. Principe

La caspase 3 est une des caspases effectrices activées lors de la phase d'exécution de l'apoptose. Elle est capable de cliver divers substrats du côté carboxy de leur résidu aspartate. Ce test permet de mesurer l'activité caspase 3 par utilisation d'un substrat artificiel de cellule qui, une fois clivé, fluoresce à 505 nm après avoir été excité à 400 nm. L'intensité de fluorescence dans un lysat cellulaire traduira l'activité caspase 3 et donc la proportion de cellules en phase d'exécution de l'apoptose pour une condition donnée.

12.2. Matériel

- Plaque 6 puits (Costar, Corning, USA)
- PBS
- Tampon de lyse (Tableau 25)
- Tampon de réaction (Tableau 25)
- Substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC caspase-3 fluorogenic substrate (BD Pharmingen) dilué dans du DMSO
- DMSO (Dimethyl Sulfoxyde) (Sigma, USA)

Différents blancs	Composition
Blanc enzyme (BE)	- 50 µl de tampon de lyse - 50 µl de tampon de réaction - 1 µl de substrat Ac-DEVD-AFC
Blanc substrat (BS)	- 50 µl d' échantillon dans du tampon de lyse - 50 µl de tampon de réaction - 1 µl de DMSO
Blanc blanc (BB)	- 50 µl d' échantillon dans du tampon de lyse - 50 µl de tampon de réaction
Formule à appliquer sur chaque valeur test : Test - BE – (BS - BB)	

Tableau 26 : Les différents blancs à réaliser lors du dosage de l' activité de la caspase 3.

12.3. Méthode

Les cellules sont préalablement repiquées en plaque 6 puits à une densité de 250 000 cellules/puits. 24 heures après le repiquage, elles sont incubées sous hypoxie durant 16 heures. L' hypoxie terminée, le milieu de chaque puits est récupéré et transféré dans un tube de 10 ml (il contient des corps apoptotiques et cellules détachées) qui est alors centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Pendant ce temps, les puits sont raclés sur glace dans 500 µl de PBS et les cellules raclées sont transférées dans un eppendorf. La centrifugation des tubes de 10 ml terminée, le surnageant est décanté, et le culot resuspendu dans 100 µl de PBS qui sont alors ajouté aux cellules des puits leur correspondant. L' ensemble est alors centrifugé à 1000 rpm et 4°C pendant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse puis placé sur roue à 4°C pour 30 minutes avant d' être centrifugé à 4°C et 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et pourra servir à la mesure de l' activité caspase. Pour ce dosage, 5 à 10 µg de protéines sont requis.

La quantité de lysat nécessaire à la quantité de protéine voulue est portée à un volume de 50 µl avec du tampon de lyse. Sont ensuite ajoutés 50 µl de tampon de réaction. Dans chaque eppendorf, est ensuite ajouté de minute en minute 1 µl de substrat, s' ensuit une heure d' incubation à 37°C dans l' obscurité au terme de laquelle la mesure de la fluorescence à 505 nm est mesurée de minute en minute. Différents blancs sont réalisés (Tableau 26).

Résultats et Discussion

Afin de vérifier l'éventuelle implication du facteur de transcription HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie de l'apoptose induite par l'étoposide, nous avons voulu mettre au point une inhibition efficace de son activité.

Deux approches différentes vont être mises en œuvre pour mener à bien cet objectif.

La première consiste en l'utilisation d'une molécule inhibitrice du facteur de transcription HIF-1 qui agit en empêchant sa liaison à l'ADN. Cette molécule s'appelle l'échinomycine.

La seconde consiste en l'utilisation de siRNA anti HIF-1 α visant à provoquer la dégradation du messenger codant cette sous-unité, l'expression de la protéine HIF-1 α est alors diminuée, empêchant ainsi la formation du facteur HIF-1. Avant de se lancer dans les expériences d'inhibition destinées à mettre en évidence le rôle de HIF-1 dans la protection apoptotique en hypoxie, il faut s'assurer de la spécificité et de l'efficacité des deux approches expérimentales qui sont envisagées. Diverses expériences préliminaires sont ainsi requises pour choisir les concentrations auxquelles les RNA-i et l'échinomycine sont les plus efficaces, mais aussi afin de vérifier la spécificité de leur effets.

1. Première approche : inhibition de HIF-1 par l'échinomycine

L'échinomycine (*Figure 1*) est une molécule synthétisée par une actinobactérie appartenant au genre streptomyces : *Streptomyces echinatus*.

Cette molécule, aussi appelée quinomycine A, est un puissant antibiotique capable entre autres d'inhiber la synthèse d'ARN chez bon nombre de procaryotes. Elle dispose également d'un important pouvoir antitumoral in vitro. C'est une petite molécule de la famille des quinoxalines qui est capable de se lier de manière séquence spécifique dans le petit sillon de l'ADN. Elle reconnaît la séquence CGTG (appelée E-box) qui est comprise dans l'élément de liaison des facteurs de transcription à motif bHLH dont HIF-1 fait partie. Sa capacité d'inhibition par rapport au facteur HIF-1 a été mise en évidence lors d'une large campagne de screening de molécules anti-cancéreuses réalisée par le National Cancer Institute. Cette molécule a été identifiée comme bonne inhibitrice du facteur de transcription HIF-1 par Kong *et al.*, (2005). Ces chercheurs ont montré qu'elle était capable d'inhiber HIF-1 dans la cellule à partir de concentrations aussi faibles que 1 nM (dans le milieu de culture). La concentration nécessaire à une inhibition optimale se situe aux alentours de 8 nM. Les mêmes auteurs ont examiné la spécificité de la molécule et ont constaté qu'elle n'interférait pas avec l'activité d'AP-1 ni de NF- κ B. Par contre, elle inhibe l'activité d'autres facteurs à motif bHLH comme c-myc mais dans une moindre mesure que HIF-1.

Avant d'utiliser l'échinomycine comme inhibiteur de HIF-1 pour vérifier le rôle de ce facteur dans la protection anti-apoptotique apportée par l'hypoxie, nous avons voulu confirmer dans notre modèle expérimental l'action inhibitrice de cette molécule sur l'activité de HIF-1. Sa spécificité a également été étudiée.

1.1. Efficacité de l'échinomycine

Afin de mesurer l'efficacité d'inhibition de l'activité de HIF-1 par l'échinomycine, nous avons suivi l'activité de ce facteur de transcription en mesurant tout d'abord sa capacité de liaison à l'ADN, processus sur lequel intervient l'échinomycine. La répercussion de cet effet sur l'activité transcriptionnelle a été étudiée d'une part en utilisant un système rapporteur, et d'autre part en suivant l'expression de deux gènes cibles de HIF-1 par real-time PCR.

Figure 1 : Structure chimique de l' échinomycine.

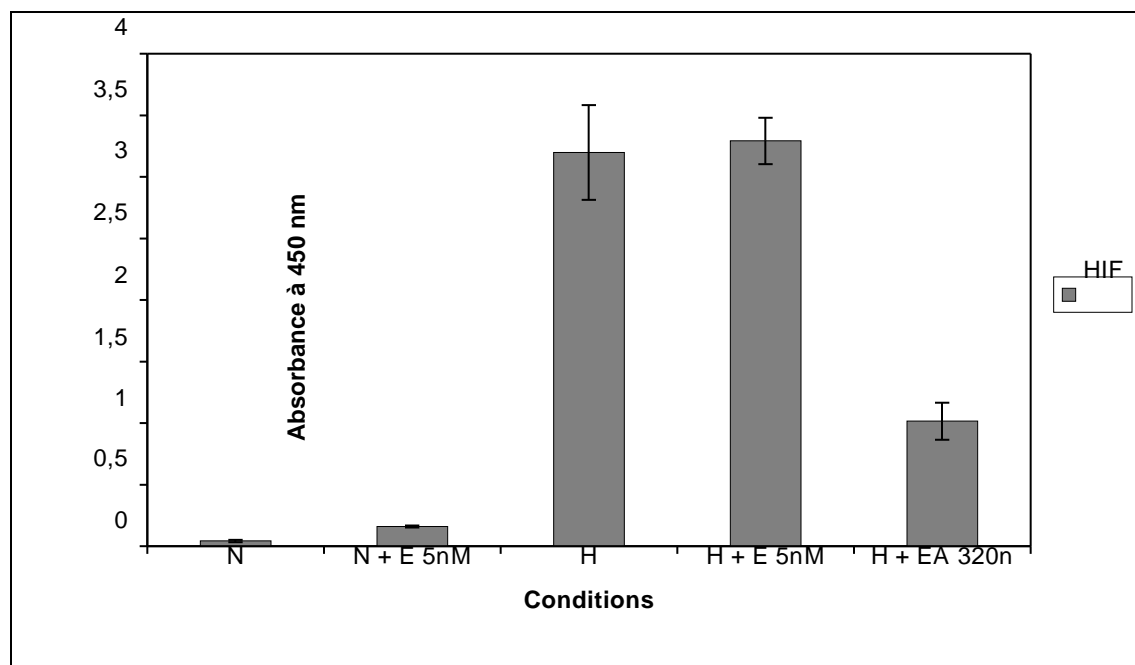


Figure 2 : Effet de l' échinomycine sur la liaison à l' ADN du facteur de transcription HIF-1 visualisée par trans-AM.

Les cellules HeLa sont incubées dans du milieu CO₂ indépendant contenant ou non une concentration de 5 nM en échinomycine pendant 5 heures en hypoxie ou normoxie. Après cette incubation, les extraits nucléaires sont réalisés et l' activité de liaison à l' ADN de HIF1 est mesurée à l' aide d' un transAM. Les résultats sont exprimés en tant que densité optique à 450 nm (moyenne \pm 1 écart-type, n=3). Les différentes conditions sont représentées en abscisse : normoxie (N), normoxie + échinomycine à 5 nM (N + E 5 nM), hypoxie (H), hypoxie + échinomycine à 5 nM (H + E 5 nM), et hypoxie + échinomycine à 320 nM directement ajoutés dans le puits lors du dosage (H + EA 320 nM).

1.1.1. Efficacité de l' échinomycine à inhiber la liaison de HIF1 à l' ADN in vitro

Les cellules sur lesquelles nous avons travaillé tout au long de ce mémoire sont des cellules de la lignée HepG2. Cependant, pour quantifier la liaison à l' ADN de HIF-1 par trans-AM, nous avons dû utiliser un autre type cellulaire, il s' agit de cellules HeLa. La raison est qu' il est difficile d' obtenir des extraits nucléaires de qualité à partir des cellules HepG2.

Etant donné que dans l' article de Kong *et al.* (2005), les concentrations décrites comme efficaces s' étalaient de 1 (début d' action) à 8 (effet plafond) nM, les concentrations que nous avons testées sont du même ordre et s' étaleront sur une fourchette allant de 1 à 10 nM pour l' ensemble des tests. Cependant, pour la première expérience une seule concentration a été utilisée : 5nM. Ces concentrations se trouvent toujours dans le milieu des cellules.

Description de l' expérience

Les cellules sont repiquées en T75 à semi confluence. Le lendemain, elles sont incubées pendant 5 heures dans du milieu de CO₂ indépendant en présence ou absence d' échinomycine à une concentration finale de 5 nM et ce, en hypoxie ou en normoxie. Au terme de cette incubation, une extraction nucléaire est réalisée. L' activité de la liaison à l' ADN de HIF1 est mesurée à l' aide d' un transAM pour les quatre conditions suivantes : normoxie, normoxie + échinomycine 5 nM, hypoxie, et hypoxie + échinomycine 5 nM. De plus, un test supplémentaire est effectué, pour lequel on ajoute directement une concentration d' échinomycine de 320 nM aux extraits de la condition hypoxie. Cette condition est importante car, comme l' échinomycine est une molécule liant l' ADN, elle peut être perdue durant l' extraction nucléaire et aucun effet ne sera alors observé lors du dosage. La concentration de 320 nM a été choisie à partir des données publiées par Kong *et al.* (2005). Ils ont en effet identifié cette concentration comme ayant les mêmes effets in vitro (pour un EMSA ou un trans-AM par exemple) que la concentration de 8 nM in vivo.

Analyse des résultats

Les résultats sont présentés graphiquement à la figure 2. On n' observe pratiquement pas d' activité de liaison à l' ADN en normoxie. Par contre, l' hypoxie provoque une très nette induction de cette activité de l' ordre de soixante fois par rapport à la normoxie. L' échinomycine semble augmenter la liaison de HIF-1 à l' ADN en normoxie. Comme l' activité de liaison à l' ADN est le reflet de l' abondance de la sous-unité HIF-1 α , ces résultats suggèrent que l' échinomycine pourrait augmenter cette abondance en normoxie. Cette hypothèse sera vérifiée ultérieurement. L' activité de liaison à l' ADN de HIF1 des cellules incubées en hypoxie en présence d' échinomycine à la concentration de 5 nM n' est pas différente de celle des cellules incubées en hypoxie sans la molécule. Cette observation correspond à la littérature et peut s' expliquer par la perte de la molécule lors de l' extraction nucléaire. Par contre, lorsque l' échinomycine est ajoutée à une concentration de 320 nM directement dans le puits du trans-AM, elle inhibe fortement la liaison du facteur au trappeur (inhibition de l' ordre de 70%). L' échinomycine s' avère donc dans ce cas très efficace.

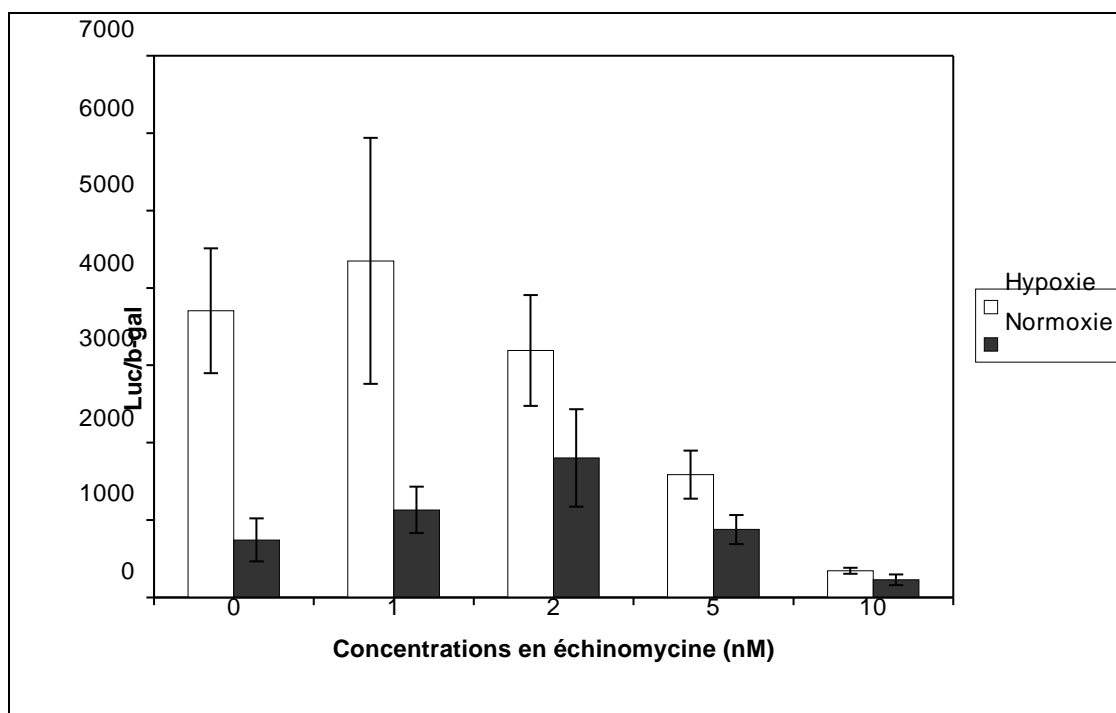


Figure 3 : Effet de l' échinomycine sur l' activité transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1 visualisée par système rapporteur.

Les HepG2 ont été repiquées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits, puis transfectées avec le plasmide rapporteur et le plasmide de normalisation. Elles ont ensuite été mises en présence de différentes concentrations en échinomycine (0, 1, 2, 5, 10 nM) dans du milieu CO₂ indépendant puis incubées en hypoxie ou normoxie pour une durée de 16 heures. Les activités de la luciférase et de la β -galactosidase ont ensuite été mesurées. Les résultats sont présentés en tant que rapport de l' activité luciférase sur l' activité β -galactosidase (Moyenne \pm 1 écart type, n=3).

1.1.2. Efficacité de l' échinomycine sur l' activité de HIF1 in-vivo

1.1.2.1. Mesure de l' activité de HIF-1 par système rapporteur

Description de l' expérience

Le système rapporteur utilisé comprend deux plasmides : un plasmide rapporteur codant pour une luciférase sous contrôle d' un promoteur artificiel comportant six éléments HRE, et un plasmide de normalisation encodant un β -galactosidase constitutivement transcrite sous contrôle d' un promoteur fort CMV. L' activité transcriptionnelle de HIF1 sera traduite par l' abondance de la luciférase, dont l' activité sera normalisée par celle de la β -galactosidase. Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits à une densité de 50 000 cellules par puits 48 heures avant la transfection. Elles sont ensuite transfectées avec les deux plasmides pendant 6 heures à l' aide de superfect. La transfection terminée, les cellules sont mises en présence de milieu CO₂ indépendant comprenant ou non de l' échinomycine aux concentrations suivantes ; 0 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, et 10 nM. Deux plaques identiques sont réalisées, une pour l' hypoxie, une pour la normoxie, et chacune des 5 conditions (0 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM et 10 nM) est réalisée en triple. Les cellules sont ensuite incubées en hypoxie ou normoxie pendant 16 heures. Le lendemain l' activité luciférase induite par HIF-1 est mesurée et normalisée par rapport à celle de la β -galactosidase.

Analyse des résultats

Les résultats, présentés à la figure 3, montrent qu' en l' absence d' échinomycine, l' hypoxie provoque une nette augmentation de l' activité transcriptionnelle du facteur HIF-1. Par contre, en présence d' échinomycine, l' activité de HIF1 en hypoxie diminue au fur et à mesure que la concentration croît. On observe une diminution en escalier à partir de 2 nM jusqu' à 10 nM. A la concentration de 10 nM, l' inhibition est quasi totale, alors que la concentration de 1 nM n' a pas d' effet. On peut observer comme dans l' expérience précédente, une augmentation d' activité/de quantité de HIF1 en normoxie pour les faibles concentrations en échinomycine. L' échinomycine est donc capable de diminuer l' activité de HIF1 dans les cellules incubées en hypoxie et annule totalement l' activité transcriptionnelle de celui-ci à une concentration de 10 nM.

1.2.2.2. Mesure de l' expression de deux gènes cible de HIF-1

Description de l' expérience

La PCR en temps réel est une technique qui permet de rendre compte de la variation d' abondance de transcrits de plusieurs messagers entre une condition contrôle et plusieurs conditions test.

Dans ce cas, nous avons étudié l' effet de l' échinomycine sur l' expression de messagers induits par HIF-1 en hypoxie. Les messagers que l' on a étudiés sont ceux de la GAPDH (Glyceraldéhyde Phosphate DesHydrogénase) et de l' aldolase, deux enzymes glycolytiques dont l' expression est accrue par HIF-1 en hypoxie. Les HepG2 ont été incubées dans du milieu CO₂ indépendant contenant ou non de l' échinomycine aux concentrations de 2 et 5 nM, puis incubées en hypoxie ou normoxie durant 16 heures. L' incubation terminée, l' ARN total est extrait, puis rétro-transcrit en ADNc, lequel pourra enfin servir de matrice à la PCR en temps réel en présence de SYBR Green et de quantités optimales d' amorces pour la GAPDH, l' aldolase ou l' α -tubuline.

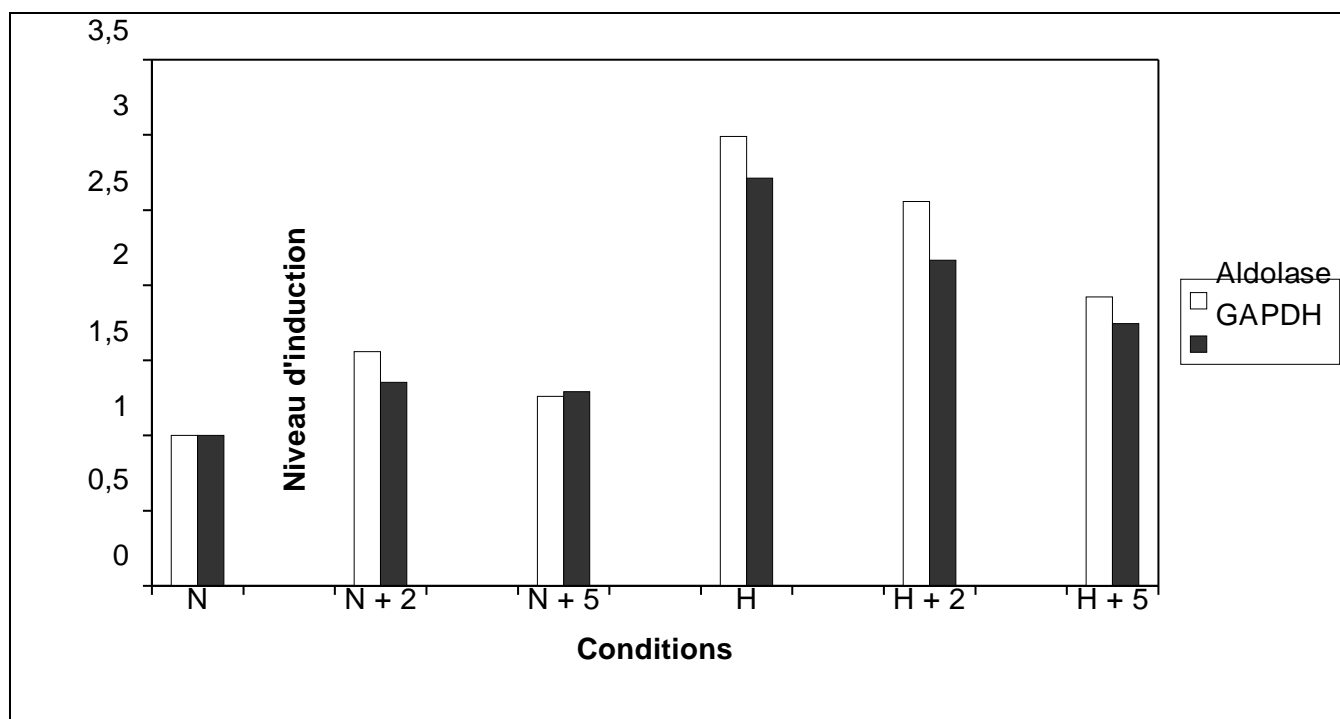


Figure 4 : Effet de l' échinomycine sur l' expression de 2 gènes cibles de HIF1.

Les HepG2 ont été incubées 16 heures, en normoxie ou en hypoxie, dans du milieu CO₂ indépendant contenant les concentrations suivantes en échinomycine : 0, 2, et 5 nM. L' ARN total a été extrait et rétro-transcrit en ADNc puis soumis à la PCR en temps réel. Le gène de référence ayant servi à normaliser les CT est, dans ce cas-ci, l' α -tubuline. Les résultats sont exprimés en niveau d' induction pour chaque transcrit normalisé avec l' α -tubuline par rapport à la condition de référence, dans ce cas-ci la normoxie (niveau d' induction = 1).

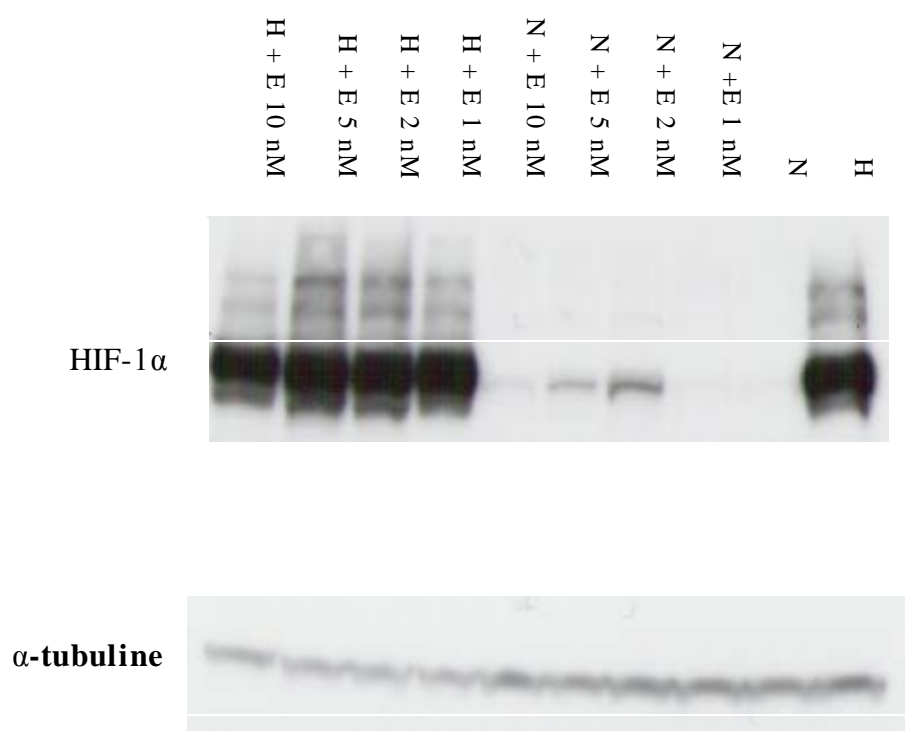


Figure 5 : Effet de l' échinomycine sur l' abondance de la protéine HIF1 α pour différentes concentrations en échinomycine en hypoxie et normoxie.

Les cellules ont été incubées 5 h en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' échinomycine à différentes concentrations (1, 2, 5, et 10 nM). Après l' incubation, les extraits totaux sont récoltés et l' abondance de HIF1 α est révélée par western blot. L' α -tubuline est également révélée et sert de contrôle de charge.

Analyse des résultats.

Les résultats sont représentés graphiquement à la figure 4. La GAPDH et l'aldolase sont toutes deux induites près de trois fois en hypoxie. L'échinomycine augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en normoxie à 2 comme à 5 nM puisqu'on observe un niveau accru des transcrits de la GAPDH et de l'aldolase. De plus, le niveau d'induction est plus important à 2 qu'à 5 nM. Cette augmentation de liaison/d'activité avait déjà été observée par deux méthodes différentes et le système rapporteur montrait également qu'en normoxie à 2 nM l'effet était plus important qu'à 5 nM.

Par contre, en hypoxie, l'échinomycine provoque bien une diminution du niveau d'induction des deux messagers induits par le facteur HIF-1. Cette diminution s'accroît quand la concentration en échinomycine croît. L'échinomycine est donc bien efficace pour inhiber la liaison du facteur HIF-1 et son activité transcriptionnelle in-vivo. Ce qui se passe en normoxie aux faibles concentrations reste cependant inexpliqué.

1.1.3. Effet de l'échinomycine en normoxie

Les observations concernant les effets de l'échinomycine en normoxie sont étonnantes. Elles engendrent une série de questions :

Quel est le mécanisme par lequel l'échinomycine accroît l'activité de HIF1 ? Et pourquoi cet accroissement n'a lieu qu'en normoxie et aux concentrations inférieures à 5 nM ? A supposer qu'elle soit due à une stabilisation de HIF-1 α en normoxie, ou à une augmentation de l'expression des messagers de HIF-1 α . Pourquoi cet effet ne serait pas contré par l'effet inhibiteur de l'échinomycine ?

Afin de comprendre les effets de l'échinomycine en normoxie, nous avons suivi la quantité de protéine (par western et immunofluorescence) ainsi que la quantité d'ARN messager (par PCR en temps réel) de HIF-1 α dans ces conditions.

1.1.3.1. Effet de l'échinomycine sur l'abondance protéique de HIF1 α

Description de l'expérience

Les cellules HepG2 sont repiquées en T25 24 heures avant les incubations en hypoxie et normoxie. Celles-ci ont lieu dans 5 ml de milieu CO₂ indépendant en présence de différentes concentrations en échinomycine (0, 1, 2, 5, 10 nM) durant 5 heures. Des extraits protéiques totaux sont ensuite réalisés et l'abondance de HIF-1 α est révélée par western blot.

Analyse des résultats

La figure 5 montre que HIF-1 α n'est pas détectable en normoxie alors que son abondance est importante en hypoxie. Celle-ci ne semble pas modifiée par les concentrations croissantes d'échinomycine, sauf peut-être légèrement à 10 nM. En normoxie, l'échinomycine induit une stabilisation de HIF-1 α à 2 nM. Cette stabilisation reste faible par rapport à celle observée en hypoxie. Cet effet disparaît à 10 nM. L'échinomycine induit donc bien une augmentation de la quantité protéique de HIF-1 α en normoxie, et de manière maximale à la concentration de 2 nM.

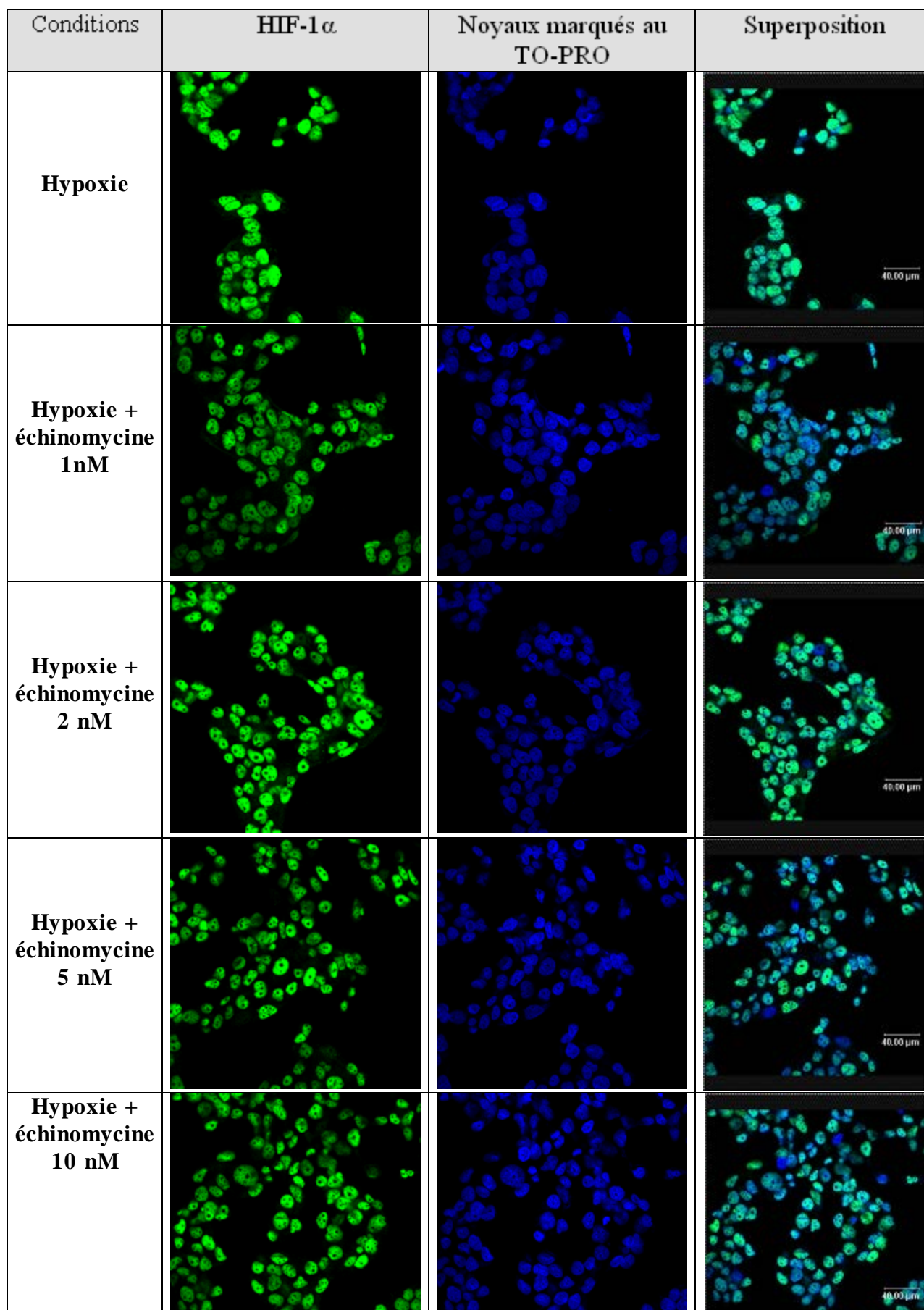
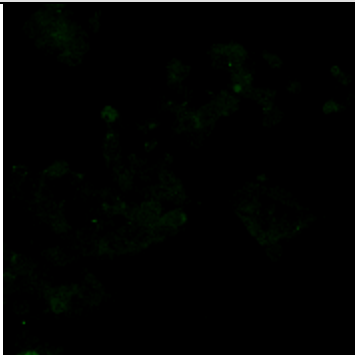
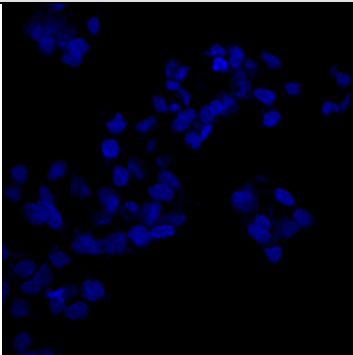
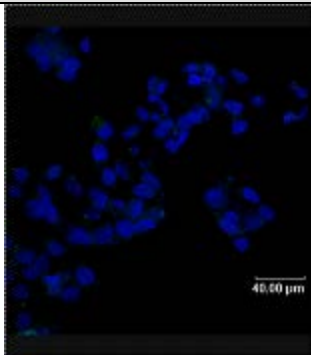
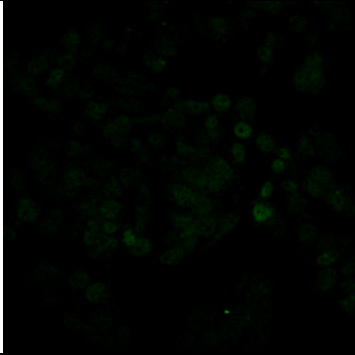
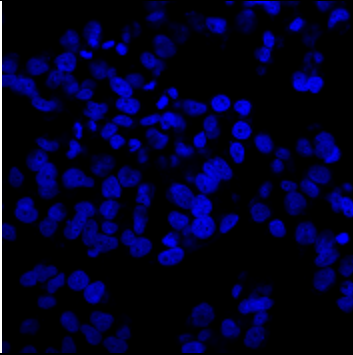
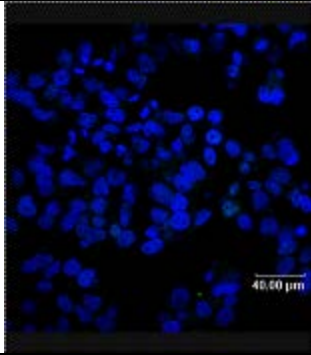
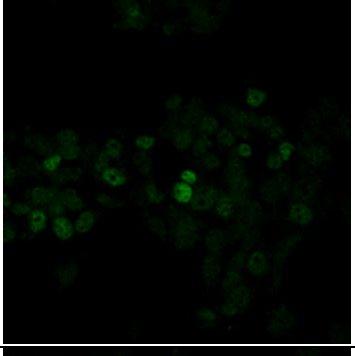
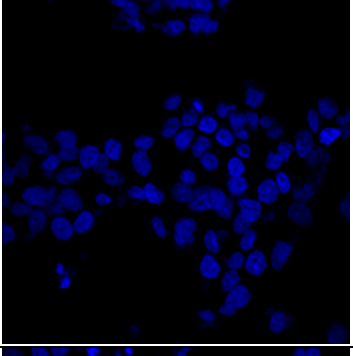
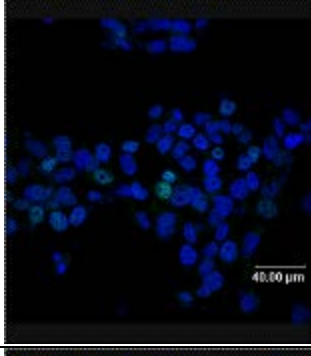
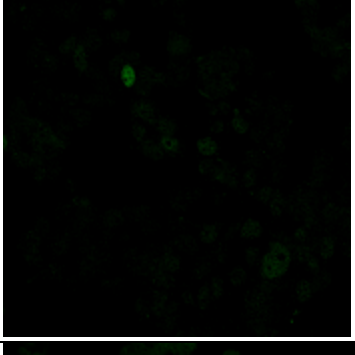
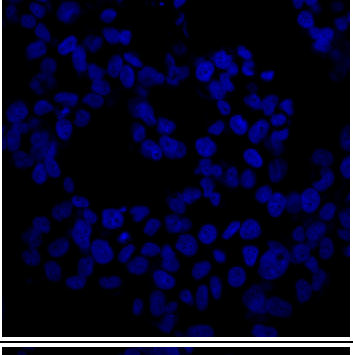
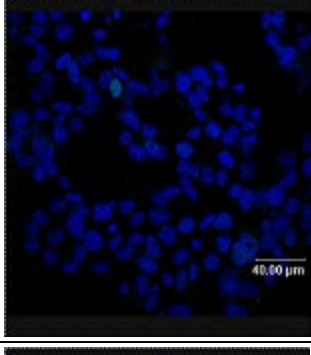
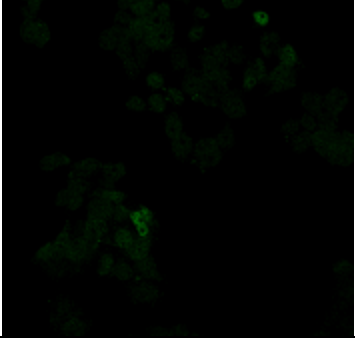
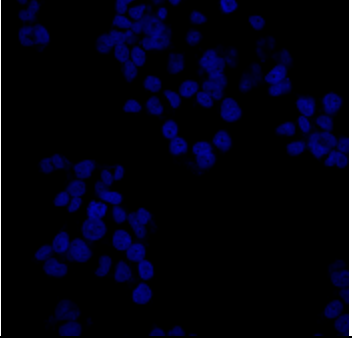
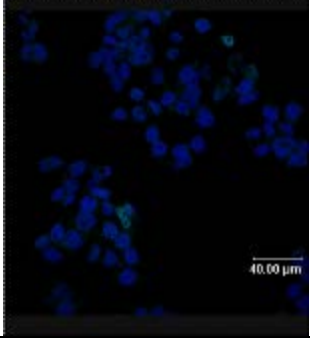


Figure 6 : Effet de l' échinomycine sur la concentration protéique et la localisation subcellulaire de HIF1 α

Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont incubées 5 heures en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' échinomycine à différentes concentrations. Le marquage est ensuite réalisé. Toutes observations sont réalisées en maintenant le PMT constant.

Conditions	HIF-1 α	Noyaux marqués au TO-PRO	Superposition
Normoxie			
Normoxie + échinomycine 1 nM			
Normoxie + échinomycine 2 nM			
Normoxie + échinomycine 5 nM			
Normoxie + échinomycine 10 nM			

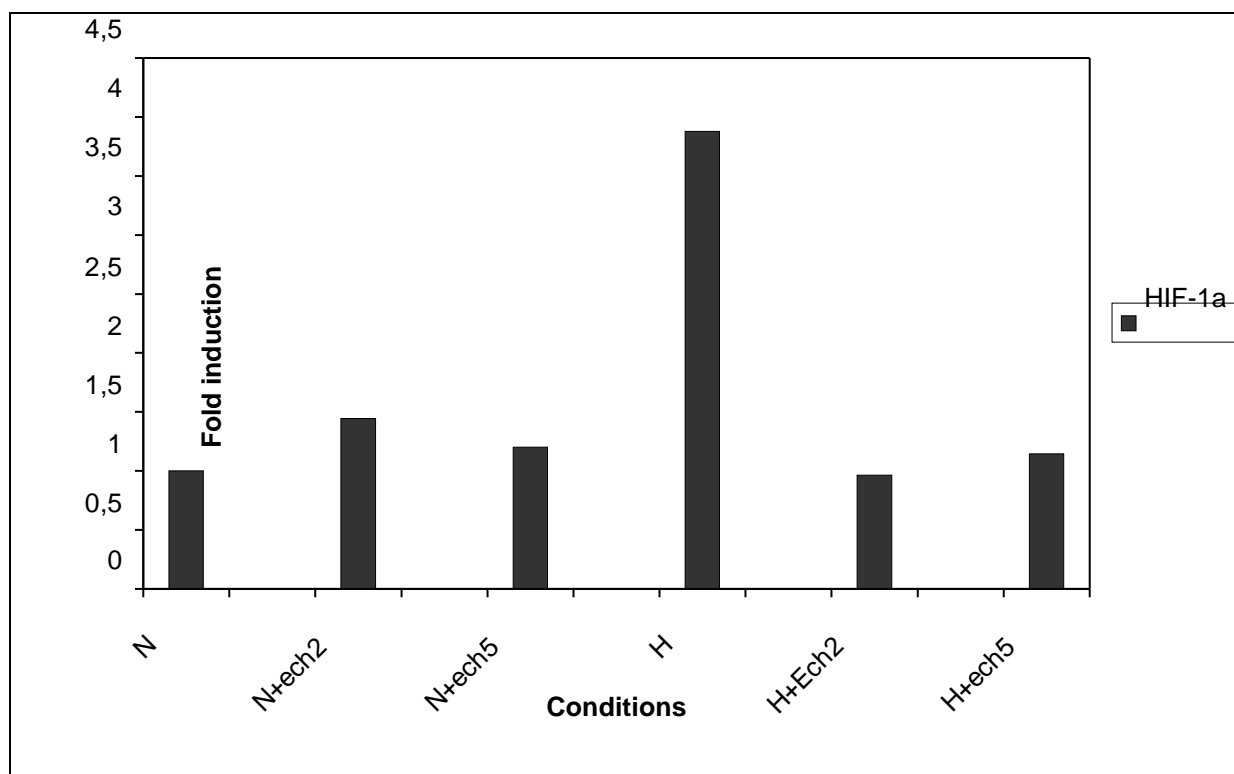


Figure 7 : Effet de l' échinomycine sur l' expression du messenger de HIF1 α .

Les HepG2 sont repiquées en T75 à semi confluence. 24 heures plus tard, elles sont incubées en hypoxie ou normoxie durant 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant comprenant ou non de l' échinomycine à 2 et 5 nM. Après cette incubation, l' ARN est extrait, rétrotranscrit, et sert de matrice pour une PCR en temps réel. Le gène de référence ayant servi à normaliser les CT est, dans ce cas-ci, l' α -tubuline. Les résultats sont exprimés en niveau d' induction pour chaque transcrit normalisé avec l' α -tubuline par rapport à la condition de référence, dans ce cas-ci la normoxie (niveau d' induction = 1).

1.1.3.2. Effet de l' échinomycine sur l' abondance et la localisation sub-cellulaire de HIF-1 α

Afin de confirmer l' augmentation de l' abondance protéique de HIF-1 α en normoxie en présence d' échinomycine observée dans l' expérience précédente et de déterminer sa localisation sub-cellulaire, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence.

Description de l' expérience

Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont incubées dans du milieu CO₂ indépendant contenant de l' échinomycine aux concentrations suivantes : 0, 1, 2, 5, et 10 nM pendant 5 heures en hypoxie ou normoxie. Elles sont ensuite fixées à la PFA 4% et perméabilisées au PBS Triton X-100 1%. La protéine HIF-1 α est alors détectée par un anticorps spécifique et les noyaux sont marqués au TO-PRO. Toutes les observations ont été réalisées en maintenant le PMT constant.

Analyse des résultats

Les résultats sont représentés à la figure 5. En hypoxie, on observe un marquage intense indiquant une abondance importante de HIF-1 α . Ce marquage est exclusivement nucléaire. Quelle que soit la concentration en échinomycine, l' abondance et la localisation de HIF-1 α ne sont pas modifiées. L' échinomycine ne modifie donc ni la localisation ni l' abondance du facteur en hypoxie, et ce à toutes les concentrations utilisées. En normoxie, la quantité de facteur présente est très faible. L' échinomycine augmente la quantité de HIF-1 α , légèrement à la concentration de 1 nM, et de manière maximale à la concentration de 2 nM. Cette augmentation est moins forte à la concentration de 5 nM. La protéine stabilisée par l' échinomycine est localisée au niveau du noyau des cellules.

1.1.3.3. Effet de l' échinomycine sur l'abondance de l' ARN messager de HIF-1 α

Afin de savoir si l' accroissement de l' abondance de HIF-1 α en normoxie observée aux faibles concentrations en échinomycine, pouvait être dû à une augmentation de la quantité du messager correspondant dans ces conditions, nous avons réalisé une PCR en temps réel visant à mesurer l' expression de cet ARNm.

Description de l' expérience

Les HepG2 sont repiquées en T75 à semi confluence. Le lendemain, elles sont incubées en hypoxie ou normoxie durant 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant contenant de l' échinomycine aux concentrations suivantes: 0, 2, et 5 nM. L' incubation terminée, l' ARN total est extrait, et les ARNm sont rétro-transcrits en ADNc. Celui-ci sert ensuite de matrice pour une PCR en temps réel en présence de SYBR Green et des quantités appropriées d' amorces pour HIF-1 α et l' α -tubuline.

Analyse des résultats

Les résultats présentés à la figure 7 montrent qu' en normoxie, le messager de HIF-1 α est plus abondant en présence d' échinomycine qu' en absence de celle-ci. La quantité est de plus plus importante à 2 qu' à 5 nM (respectivement 1,44 et 1,2 x plus abondant qu' en normoxie). Toutes les expériences réalisées précédemment indiquent que l' activité du facteur (de liaison à l' ADN ou transcriptionnelle) et l' abondance protéique sont toutes deux plus importantes à 2

qu' à 5 nM. Les résultats de cette expérience nous montrent que tous les effets que nous avons observés peuvent, au moins en partie, être le fruit d' une abondance accrue du messenger de HIF-1 α . En hypoxie, l' abondance du messenger est également accrue de près de 4 x par rapport à la normoxie, et lorsque l' échinomycine est présente, à 2 ou à 5 nM, la quantité est proche de celle observée en normoxie (respectivement 0,96 et 1,14 x plus abondante). L' accroissement de la transcription du messenger de HIF-1 α en hypoxie est un phénomène connu chez les HepG2 (Minet *et al.*, 1999), on suppose que cette augmentation serait due à un taux de transcription accru suite à l' action du facteur de transcription activé par l' hypoxie qui viendrait se fixer à un élément cis en amont du site + 1 et augmenter la transcription du gène codant HIF-1 α .

1.1.3.4. Conclusions

L' ensemble des résultats obtenus jusqu' à présent montre que l' échinomycine est capable d' inhiber efficacement l' activité de HIF-1 en hypoxie. Cette inhibition est observée de manière croissante entre 2 et 10 nM, ce qui correspond aux résultats publiés par Kong *et al.* (2005). Au cours de ces expériences, nous avons fait une observation inattendue : l' échinomycine augmente la liaison à l' ADN et l' activité du facteur de transcription en normoxie, et cette augmentation est optimale à la concentration de 2 nM. Pour avoir des informations complémentaires sur les différents effets de l' échinomycine et pour savoir si ces augmentations pouvaient être corrélées à une quantité accrue de la sous-unité HIF-1 α du facteur, nous avons effectué un western et une immunofluorescence. Tous deux indiquent clairement qu' à 2 nM l' augmentation de HIF1 α est effectivement plus importante qu'aux autres concentrations et que la quantité de celui-ci pouvait être représentée comme une courbe de Gauss centrée sur 2 nM avec les concentrations supérieures et inférieures de part et d' autre. Nous avons voulu savoir si cette concentration accrue était liée à une augmentation de l' abondance du messenger de HIF-1 α et nous avons réalisé une PCR en temps réel. Celle-ci nous a révélé que la quantité de messenger fluctuait parallèlement à la concentration protéique en normoxie. Nous avons donc émis l' hypothèse qu' en normoxie à 2 nM, l' échinomycine interférerait avec des facteurs répresseurs de la transcription du messenger. En effet, il existe dans la 5' UTR une séquence de 100 paires de bases qui réprime la transcription du messenger de HIF-1 α en normoxie (Minet *et al.* 1999). Nous émettons l' hypothèse qu' en normoxie, l' échinomycine interférerait avec l' activité du ou des répresseurs interagissant dans cette zone, et ce préférentiellement à la concentration de 2 nM. Lorsque l' on analyse cette zone de 100 paires de bases, on constate que celle-ci contient plusieurs éléments cis reconnus par différents facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, on retrouve un régulateur négatif de la transcription, AML1a (Acute Myeloid Leukemia 1). Nous proposons donc qu' en normoxie et particulièrement à la concentration de 2 nM, l' échinomycine pourrait interférer avec la liaison à l' ADN de ce régulateur négatif. Cette hypothèse reste à vérifier. Cependant, il n' est pas exclu que l' échinomycine puisse augmenter la liaison, l' activité transcriptionnelle, et ou la concentration protéique de HIF-1 par d' autres voies. Ainsi, l' échinomycine pourrait par exemple inhiber les prolyl-hydroxylases, le protéasome, ou encore augmenter la quantité du messenger de HIF-1 α non pas via une transcription accrue, mais en induisant sa stabilisation. Les hypothèses sont nombreuses, mais nous n' avons pas pu les explorer dans le contexte de ce mémoire faute de temps.

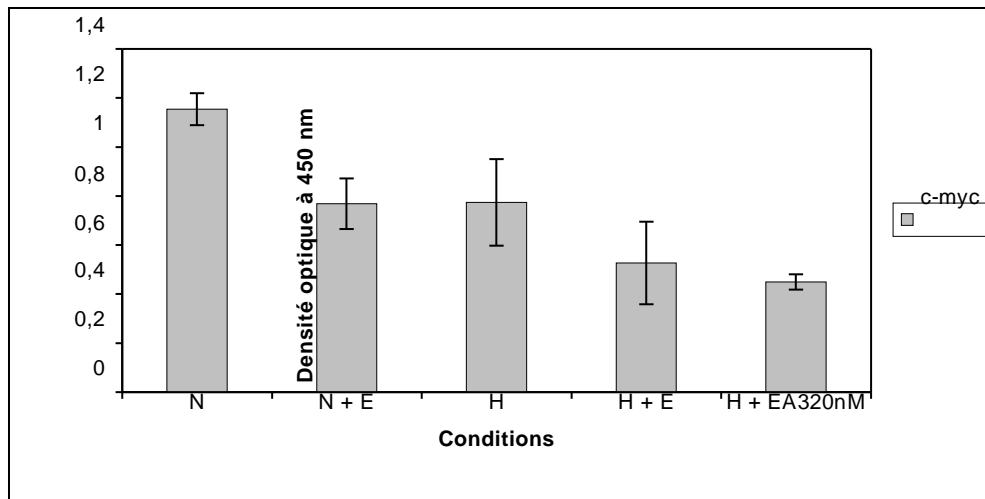


Figure 8 : Effet de l' échinomycine sur l' activité de liaison à l' ADN du facteur de transcription c-myc.

Les cellules HeLa sont incubées dans du milieu CO₂ indépendant contenant ou non une concentration de 5 nM en échinomycine pendant 5 heures en hypoxie ou normoxie. Après cette incubation, les extraits nucléaires sont réalisés et l' activité de liaison à l' ADN de c-myc est mesurée à l' aide d' un transAM. Les résultats sont exprimés en tant que densité optique à 450 nm (moyenne \pm 1 écart-type, n=3). Les différentes conditions sont représentées en abscisse : normoxie (N), normoxie + échinomycine à 5 nM (N + E 5 nM), hypoxie (H), hypoxie + échinomycine à 5 nM (H + E 5 nM), et hypoxie + échinomycine à 320 nM directement ajoutés dans le puits (H + EA 320 nM).

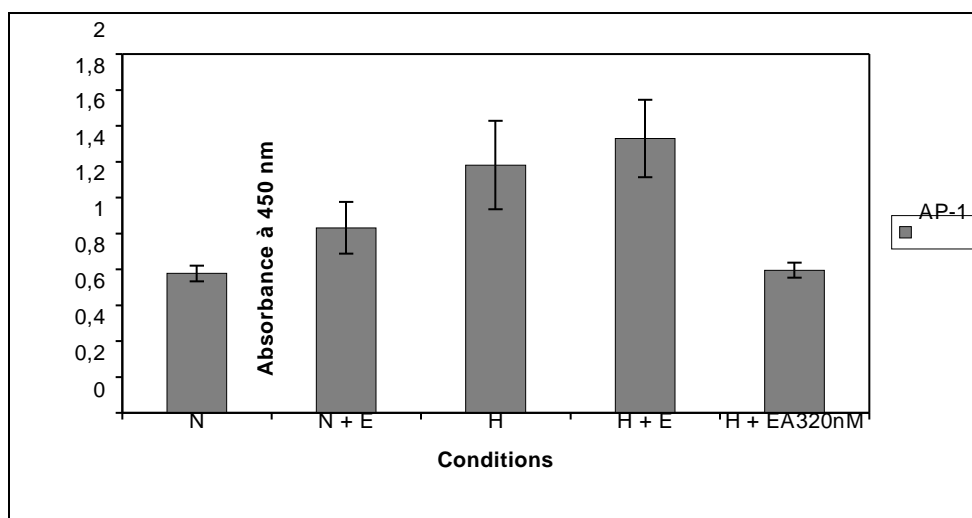


Figure 9 : Effet de l' échinomycine sur l' activité de liaison à l' ADN du facteur de transcription AP-1.

Les cellules HeLa sont incubées dans du milieu CO₂ indépendant contenant ou non une concentration de 5 nM en échinomycine pendant 5 heures en hypoxie ou normoxie. Après cette incubation, les extraits nucléaires sont réalisés et l' activité de liaison à l' ADN de AP-1 est mesurée à l' aide d' un transAM. Les résultats sont exprimés en tant que densité optique à 450 nm (moyenne \pm 1 écart-type, n=3). Les différentes conditions sont représentées en abscisse et sont identiques à celles de l' expérience précédente.

1. 2. Spécificité de l' échinomycine

Les expériences précédentes montrent une efficacité importante de l' échinomycine pour inhiber l' activité de HIF-1 en hypoxie. Cette molécule était décrite dans la littérature comme assez spécifique, n' interférant pas avec toute une série de facteurs de transcription comme AP-1 ou NF- κ B. Elle inhibe cependant la liaison à l' ADN de facteurs à motif bHLH comme c-myc (Kong *et al.*, 2005). En effet, la séquence qu' elle reconnaît est contenue dans l' élément de réponse des facteurs à motif bHLH (comme c-myc, myo D, et HIF-1). Afin de s' assurer de sa spécificité dans nos conditions expérimentales, nous avons effectué plusieurs expériences. D' une part, des tests de liaison à l' ADN pour voir si l' échinomycine interfère avec la liaison à l' ADN de facteurs à motif bHLH comme c-myc, ainsi que pour voir dans quelle mesure elle n' interfère pas avec la liaison des facteurs qui ne contiennent pas ce motif. Nous avons choisi AP-1, car son activité est tout comme celle de HIF-1, augmentée en hypoxie. D' autre part, nous avons utilisé des systèmes rapporteurs pour pouvoir visualiser d' éventuelles modifications de l' activité transcriptionnelle de c-myc (facteur à motif bHLH), et d' AP-1 (facteur autre).

1.2.1. Activité de liaison à l' ADN des facteurs c-myc et AP-1 en présence d' échinomycine

1.2.1.1. Activité de liaison à l' ADN de c-myc

Les cellules sont repiquées en T75 à semi confluence. 24 heures plus tard, elles sont incubées 5 heures en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant comprenant ou non de l' échinomycine à la concentration de 5 nM. Les protéines nucléaires sont alors extraites et la liaison à l' ADN de c-myc est mesurée par trans-AM pour les conditions suivantes. N (normoxie), N + E (cellules incubées en normoxie dans du milieu comprenant une concentration en échinomycine de 5 nM), H (hypoxie) et H + E (cellules incubées en hypoxie dans du milieu contenant de l' échinomycine à 5 nM). Comme pour le transAM HIF-1, un test supplémentaire est effectué, de l' échinomycine à concentration de 320 nM est ajoutée dans des puits contenant les extraits de la condition hypoxie.

Analyse des résultats

Les résultats, présentés graphiquement à la figure 8, montrent que l' hypoxie diminue légèrement l' activité de liaison à l' ADN de c-myc. L' incubation des cellules en présence d' échinomycine engendre également une diminution de la liaison à l' ADN, et ce en normoxie comme en hypoxie. Lorsque l' échinomycine est ajoutée dans le puits du transAM à une concentration de 320 nM, elle interfère avec la liaison de c-myc à son trappeur. L' inhibition que l' on observe ici est de l' ordre de 30%. Kong *et al.* (2005) avaient eux aussi observé un effet de l' échinomycine sur la liaison à l' ADN de ce facteur à motif bHLH, mais cet effet était plus important.

1.2.1.2. Activité de liaison à l' ADN de AP-1

Les conditions expérimentales de cette expérience sont identiques à celles de la précédente.

Analyse des résultats

Les résultats sont présentés graphiquement à la figure 9. L' activité de liaison à l' ADN de AP-1 augmente en hypoxie, ce qui avait déjà été observé au laboratoire précédemment (A).

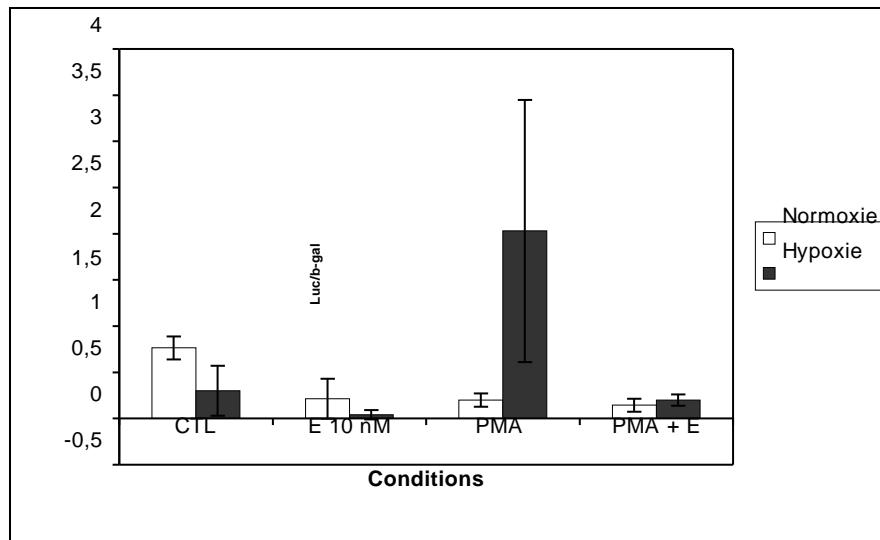


Figure 10 : Effet de l' échinomycine sur l' activité transcriptionnelle du facteur ϵ myc visualisée par système rapporteur.

Les HepG2 ont été repiquées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits, puis transfectées avec le plasmide rapporteur et le plasmide de normalisation. Elles ont ensuite été incubées pendant 16 heures en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' échinomycine (10 nM) ou de PMA (100 nM). Les activités de la luciférase et de la β -galactosidase ont ensuite été mesurées. Les résultats sont présentés en tant que rapport de l' activité luciférase sur l' activité β -galactosidase (moyenne \pm 1 écart type, n=3)

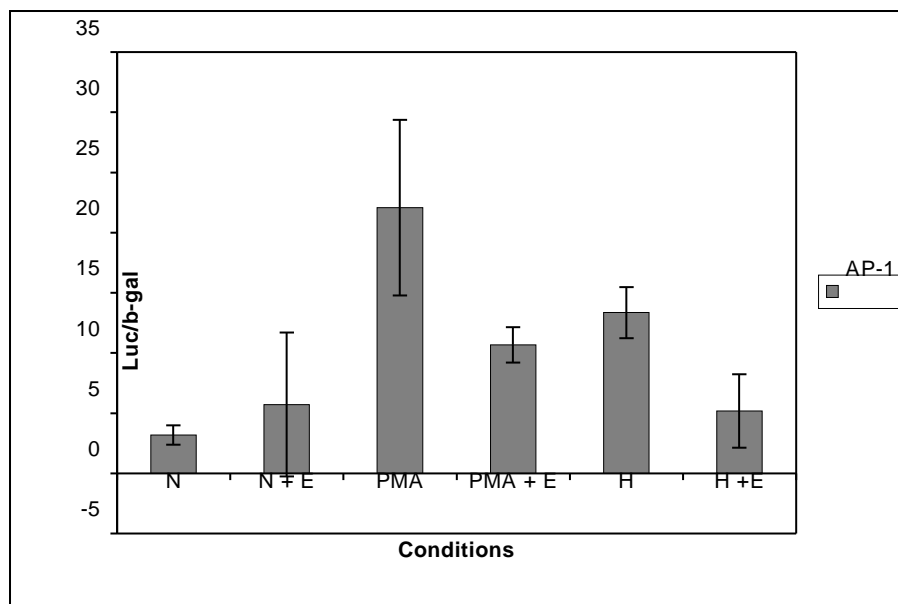


Figure 11 : Effet de l' échinomycine sur l' activité transcriptionnelle du facteur AP-1 visualisée par système rapporteur.

Les HepG2 ont été repiquées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits, puis transfectées avec le plasmide rapporteur et le plasmide de normalisation. Elles ont ensuite été incubées pendant 16 heures en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' échinomycine (10 nM) ou de PMA (100 nM). Les activités de la luciférase et de la β -galactosidase ont ensuite été mesurées. Les résultats sont présentés en tant que rapport de l' activité luciférase sur l' activité β -galactosidase (moyenne \pm 1 écart type, n=3).

Sermeus, mémoire de licence). L' échinomycine à 5nM en hypoxie comme en normoxie semble augmenter la liaison de AP-1 à son trappeur. Lorsque l' échinomycine est présente à raison de 320 nM dans le puits, elle engendre une forte inhibition de la liaison de AP-1 à son trappeur (de l' ordre de 50%). Ce résultat indique que l' échinomycine interfère avec la liaison de ce facteur à l' ADN alors que les résultats de la littérature montrent qu' elle n' interfère pas avec AP-1, et ce même à des concentrations aussi importantes que 10 µM (Kong *et al.*, 2005). AP-1 n' est pourtant pas un facteur à motif bHLH, et la séquence CGTG n' est donc pas comprise dans l' élément cis qu' il reconnaît. Afin de vérifier dans un système cellulaire cette observation obtenue in vitro, nous avons étudié l' effet de l' échinomycine sur l' activité de c-myc et de AP-1 en utilisant un système rapporteur.

1.2.2. *Activité transcriptionnelle des facteurs c-myc et AP-1 en présence d' échinomycine*

1.2.2.1. Le système rapporteur c-myc : description de l' expérience

Les cellules HepG2 sont repiquées à 50 000 cellules par puits 48 heures avant la transfection. Elles sont ensuite transfectées avec les plasmides rapporteur pmyc-Luc (contenant 4 sites de liaison pour c-myc) et de normalisation pCMV β-gal à l' aide de Superfect durant 6 heures. La transfection terminée, elles sont incubées en hypoxie ou normoxie dans 1 ml de milieu CO₂ indépendant durant 16 heures avant d' être lysées. Les activités luciférase et β-galactosidase sont ensuite mesurées. Les différentes conditions sont : Contrôle : cellules incubées en hypoxie ou normoxie en l' absence d' échinomycine E 10 nM : cellules incubées en hypoxie ou normoxie en présence d' une concentration d' échinomycine de 10 nM- PMA : cellules incubées en hypoxie ou normoxie en présence de PMA à une concentration de 100 nM (le PMA est utilisé pour provoquer une activation importante du facteur, c' est un contrôle positif) - PMA + E : cellules incubées en hypoxie ou normoxie en présence de PMA 100 nM et d' échinomycine 10 nM.

Analyse des résultats

Les résultats sont présentés graphiquement à la figure 10. En l' absence d' échinomycine, l' activité de c-myc est moindre en hypoxie qu' en normoxie. En présence d' échinomycine à la concentration de 10 nM, l' activité est réduite aussi bien en normoxie qu' en hypoxie. Ces effets sont similaires à ceux que nous avons observés en mesurant l' activité de liaison à l' ADN. Ils indiquent que l' échinomycine, en plus d' inhiber la liaison de c-myc à l' ADN in vitro, réduit aussi son activité transcriptionnelle. Le PMA induit une forte augmentation de l' activité du facteur en hypoxie. Lorsque de l' échinomycine à 10 nM est ajoutée en présence de PMA, la diminution d' activité est très importante (10 x). Ces résultats montrent que l' échinomycine inhibe l' activité transcriptionnelle du facteur de transcription c-myc.

1.2.2.2. Le système rapporteur AP-1

Un système rapporteur a également été utilisé pour étudier l' effet de l' échinomycine sur l' activité transcriptionnelle du facteur AP1. Dans ce cas-ci, le plasmide rapporteur est le pAP-1-Luc (Stratagène), dans lequel le gène de la luciférase est placé sous la dépendance de 7 sites AP-1.

	Inhibition par l'échinomycine	
	Trans-AM	Système rapporteur
HIF-1	70%	100%
AP-1	50%	50%
c-myc	30%	~ 80%

Tableau 1 : Récapitulation des effets inhibiteurs de l' échinomycine sur différents facteurs dont l' activité de liaison a été mesurée par transAM et l' activité transcriptionnelle par système rapporteur.

Analyse des résultats

Les résultats présentés graphiquement à la figure 11 indiquent que l'activité d'AP1 est accrue en hypoxie par rapport à la normoxie. L'échinomycine ne semble pas affecter la faible activité de AP-1 en normoxie, mais diminue de moitié son activité en hypoxie. Le contrôle positif (PMA) a bien fonctionné, puisque l'augmentation de l'activité de AP1 est sept fois supérieure à celle observée en normoxie. L'échinomycine inhibe fortement l'activité du facteur AP-1, car lorsque le contrôle positif est additionné d'échinomycine à 10 nM, l'activité de AP-1 chute de moitié.

Deux tests confirment l'inhibition du facteur AP-1 par l'échinomycine. Le transAM confirme l'activité de l'échinomycine comme inhibitrice de la liaison du facteur à sa séquence cible, et le système rapporteur illustre son aptitude à diminuer l'activité transcriptionnelle du facteur *in vivo*. Ces deux approches différentes indiquent des degrés d'inhibition similaires, c'est-à-dire de l'ordre de 50%. Bien que décrite comme spécifique vis-à-vis des facteurs à motif bHLH, l'échinomycine interfère fortement avec le facteur AP-1 qui ne contient pas ce motif.

1.3. Conclusions.

L'échinomycine s'est avérée très efficace vis-à-vis du facteur de transcription HIF-1 aussi bien au niveau de sa liaison à l'ADN qu'au niveau de son activité transcriptionnelle en hypoxie. Elle est effectivement capable d'inhiber totalement l'activité de ce facteur à des concentrations aussi faibles que 10 nM et présente déjà des effets importants à 5 nM. Cependant, certaines choses sont dérangeantes et son utilisation risque de ne pas être appropriée pour la suite de ce mémoire dans le cadre de l'étude envisagée. En voici les diverses raisons.

- Manque de spécificité (Tableau 1) : Les tests que nous avons réalisés nous ont montré que l'échinomycine interférerait bel et bien avec d'autres facteurs bHLH. Nous avons vu qu'elle pouvait interférer avec c-myc, mais nous n'avons pas testé d'autres facteurs. Si elle inhibe tous les facteurs possédant ce motif dans la même mesure que c-myc, elle pourrait provoquer toute une série d'effets non spécifiques préjudiciables à notre étude. Elle est de plus capable d'inhiber de manière significative des facteurs ne possédant pas le motif bHLH comme AP-1. Si cette inhibition n'est dans ce cas pas due à son aptitude à encombrer le site reconnu par le facteur, mais à une association allostérique perturbatrice, dans quelle mesure ne serait-elle pas capable de « s'associer » avec d'autres facteurs pour en altérer la faculté de liaison à l'ADN ? Nous n'avons pas eu le temps de tester son effet sur d'autres facteurs mais cette possibilité en plus de son effet sur AP-1 diminue encore la spécificité de l'échinomycine.
- Peu après le début des expériences, un article récent qui montre que l'échinomycine est un bon inducteur d'apoptose chez les cellules de cancer de côlon HT-29 a été publié (Park *et al.*, 2006). Cette induction de l'apoptose par l'échinomycine implique les caspases 9 et 3. Dans le cadre de ce mémoire où le but est de vérifier la protection apoptotique en hypoxie, cet effet risque d'être perturbateur même si les concentrations auxquelles elle s'est avérée efficace dans ce domaine sont de l'ordre de 100 fois supérieures à celles nécessaires à l'inhibition de HIF1. Nous n'avons en effet pas observé de toxicité de l'échinomycine dans nos conditions expérimentales.
- Augmentation de la quantité de HIF-1 α en normoxie aux faibles concentrations : peu d'études ont été réalisées sur l'échinomycine et l'influence qu'elle peut avoir au

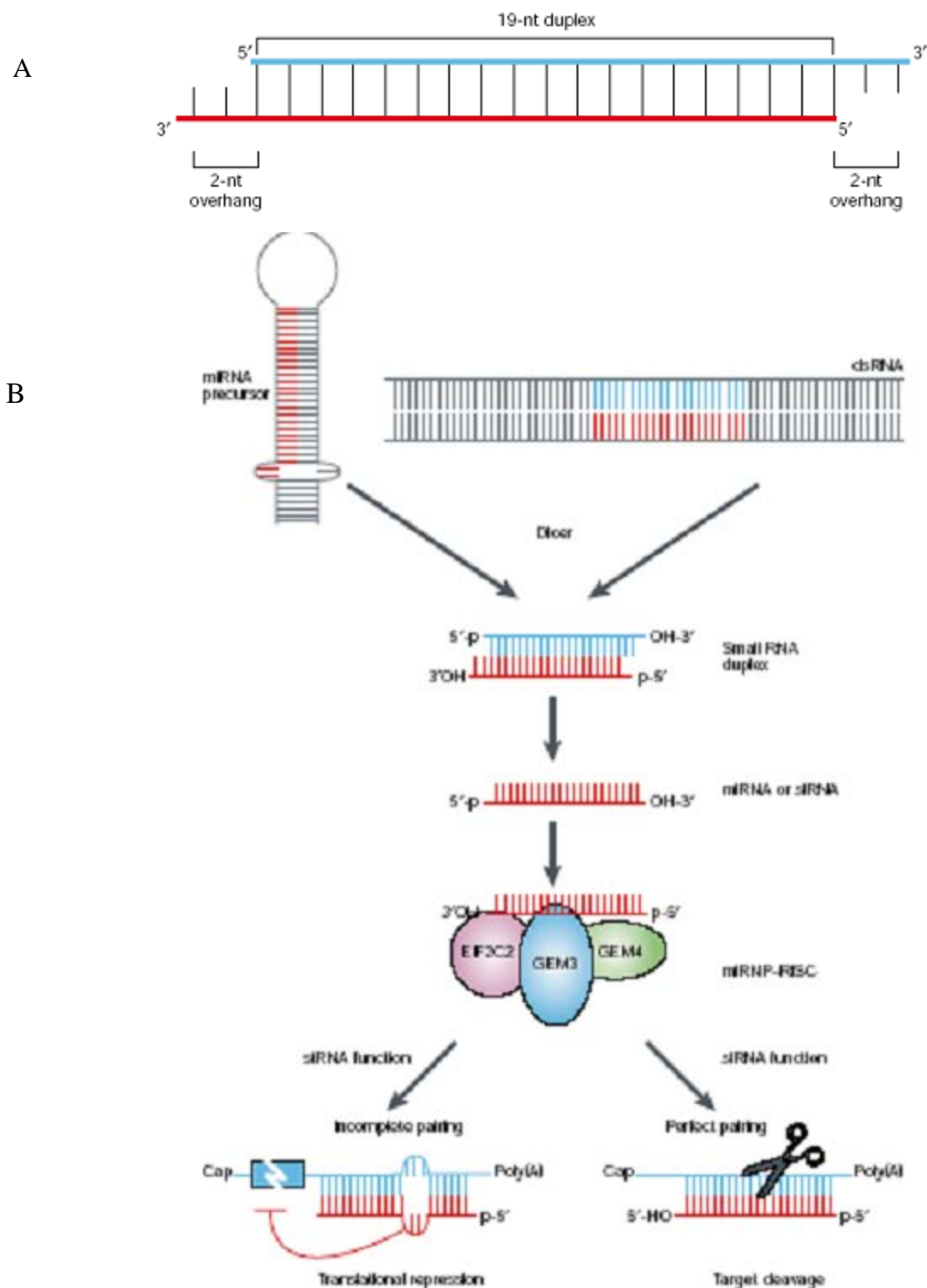


Figure 12 : Structure d'un siRNA et représentation schématique du mode d'action des si-RNA et mi-RNA.

A : Structure d'un siRNA avec le « 3' overhang » de 2 nucléotides.

B : Mode d'action des siRNA et mi-RNA. Les ARN double brins, ou les structures en épingle à cheveux, sont reconnues par Dicer, une nucléase, qui va les cliver en si ou st RNA (Short Temporal RNA) qui pourront ensuite être désappariés par RISC et former avec celui-ci un complexe à même de s'associer au messager. En fonction du degré d'homologie entre le petit brin d'ARN et le messager, celui-ci sera clivé (si-RNA) ou sa traduction sera bloquée (st-RNA) (McManus and Sharp, 2002).

niveau des « pathways cellulaires ». Son affinité pour l'ADN est connue depuis longtemps, mais son pouvoir d'inhibition par rapport à certains facteurs comme HIF1, ainsi que son aptitude à déclencher l'apoptose sont des découvertes relativement récentes (2005-2006). Il est donc fort possible que cette molécule soit capable d'un très grand nombre d'interactions qui seraient modulées par le type cellulaire, la concentration en échinomycine, et les conditions globales d'incubation avec celle-ci. Nous avons effectivement montré qu'elle pouvait augmenter l'abondance de HIF1 α en normoxie, et que cette augmentation pourrait être due au moins en partie à une augmentation de son ARNm (qui serait le résultat d'une transcription accrue ou d'une stabilisation du messenger). Dans quelle mesure ne serait-elle pas capable d'agir de la sorte sur un grand nombre de protéines ?

Toutes ces raisons nous ont poussés à mettre de côté l'échinomycine pour la suite de ce mémoire et une autre approche a donc dû être envisagée afin d'inhiber l'activité de HIF1.

2. Seconde approche : inhibition de HIF-1 par les si-RNA anti HIF-1 α .

2.1. Introduction

2.1.1. Bref rappel du principe de fonctionnement des si-RNA

Les si-RNA (Small Interfering RNA) sont des petits ARN double brin d'une longueur de 19 à 23 nucléotides comportant un 3' «overhang» de 2 nucléotides. Dans la cellule, ils peuvent être reconnus par un complexe multiprotéique : RISC (RNA Induced Silencing Complex). Celui-ci va les fixer et désappairer les deux brins. En fonction de la structure du si-RNA, RISC va s'introduire par l'un ou l'autre côté du siRNA (cela dépend des bases situées aux extrémités ; les couples A-T se désappairent plus facilement que les couples G-C) et selon l'extrémité par laquelle RISC procède au désappariement, il va s'associer au brin sens ou antisens. Lorsqu'il est associé au brin antisens, le complexe formé peut reconnaître le messenger duquel le si-RNA est spécifique. En fonction du degré d'homologie entre le brin du si-RNA et celui du messenger, et donc de la qualité de l'appariement, RISC pourra répondre de deux manières. Si l'appariement est parfait ou presque, il va provoquer la dégradation du messenger par clivage alors que si l'appariement comprend quelques «mismatches», RISC va bloquer la traduction du messenger. Dans les deux cas, la protéine encodée par le messenger n'est plus, ou moins traduite. Ce mécanisme que nous exploitons par l'utilisation des siRNA est en fait un mécanisme ancestral que beaucoup d'eucaryotes possèdent. Ce mécanisme pourrait entre autres protéger les cellules de virus, d'éléments génétiques transposables, ou encore les prémunir de l'effet de transcrits aberrants. Ce système est activé en réponse à la présence d'ARN double brin (Figure 12). Ces ARN double brin sont reconnus et clivés en petits fragments de 19 à 23 nucléotides possédant un 3' «overhang» de deux nucléotides par Dicer. S'ensuit l'étape décrite précédemment avec RISC qui va induire le clivage du messenger ou l'inhibition de la traduction. A ce stade, une étape d'amplification de la réponse peut également se passer. En effet, le si-RNA apparié au messenger peut servir d'amorce à une RdRP (RNA dependent RNA Polymerase) qui va régénérer de l'ARN double brin à partir duquel de nouveaux si-RNA pourront être clivés par Dicer. En plus de diriger la dégradation du messenger lui correspondant, les si-RNA peuvent aussi guider la méthylation de la zone du génome (méthylation des cytosines et des histones) de laquelle ce messenger est originaire et ainsi en induire le remodelage, l'empêchant d'être transcrit et bloquant également les transposons et virus y étant éventuellement présents.

Ce système de défense est maintenant exploité par la science, et c' est un outil d' étude puissant et très prisé. Il est extrêmement utilisé dans divers domaines et la bonne efficacité de silencing que les si-RNA offrent permet d' investiguer le rôle de bon nombre de protéines. En effet, avec une bonne efficacité de transfection et des si-RNA bien conçus, il est possible en fonction du type cellulaire, d' obtenir une efficacité de silencing allant de 70 à plus de 90%. Quelques règles doivent être suivies pour concevoir un si-RNA efficace et spécifique. Elles sont au nombre de quatre et sont ce que l' on appelle le «conventional design » :

- La séquence que l' on choisit doit se situer entre 75 et 100 nucléotides en aval du codon start pour éviter qu' elle ne corresponde à une zone du messager encombrée par des protéines régulatrices.
- Dans la zone codante appropriée, il faut choisir une région ayant le profil : AA(N19)TT, si c' est impossible on opte pour quelque chose comme: NA(N21). Les adénosines disposées de la sorte permettent à RISC de désappairer facilement le double brin et préférentiellement de manière à ce qu' il s' associe avec le brin antisens.
- Le taux de GC du si-RNA doit idéalement être de plus ou moins 50%. Si pas, il doit être compris entre 30 et 70%
- Il faut enfin s' assurer de la spécificité du siRNA vis-à-vis de l' ARN messager à cibler en faisant des alignements de séquence BLAST pour être sûr de ne pas toucher d' autres ARNm.

2.1.2. Les si-RNA provenant de chez Dharmacon

Les expériences de transfection avec des RNA-i réalisées les années précédentes au laboratoire sur les cellules HepG2 offraient une efficacité de silencing de l' ordre de 50% (Jean Philippe Cosse, mémoire de licence, 2004). Les HepG2 sont effectivement des cellules historiquement reconnues comme difficiles à transfecter. Pour essayer d' avoir une efficacité de transfection et un silencing optimum, un nouveau type de si-RNA et d' agent de transfection a été utilisé dans ce mémoire. Ces deux produits proviennent de chez Dharmacon et sont prévus pour garantir une efficacité de silencing d' au moins 75% sur les cellules HepG2. Les si-RNA proposés sont en fait un pool de 4 si-RNA différents étant chacun isolément efficace et spécifique (« smart pool »). L' agent transfectant est un agent lipofectant spécialement conçu pour transfecter des petites séquences d' ARN double brin. Il présente de plus une faible toxicité autorisant des transfections de longue durée (24 h) et offrant ainsi tous les atouts pour une transfection efficace. Les si-RNA constituant le smart-pool ont été conçus suivant un « rational design » qui est un mode de conception englobant les 4 critères « classiques » entrant dans l' élaboration des si-RNA conçus par « conventional design », ainsi que 8 autres. Il s' agit d' études bioinformatiques poussées permettant d' optimiser la séquence des si-RNA afin d' augmenter leur efficacité. Ainsi certains nucléotides en position particulière sont corrélés à une fonctionnalité plus importante. Ce pool de si-RNA transfecté avec l' agent lipofectant de faible toxicité (Dharmafect N°1) est annoncé par la firme comme capable d' induire la dégradation de l' ARN messager à près de 95%.

2.2. Etude de l' efficacité de silencing des si-RNA anti HIF-1 α

Comme pour l' échinomycine, nous avons effectué une série d' expériences pour s' assurer de l' efficacité de ce produit ainsi qu' en trouver les concentrations optimales d' utilisation. Dans un premier temps, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence de la protéine ciblée, ici HIF-1 α , car c' est un test qui nous permet de voir rapidement l'efficacité des si-RNA sur l' abondance protéique de HIF-1 α .

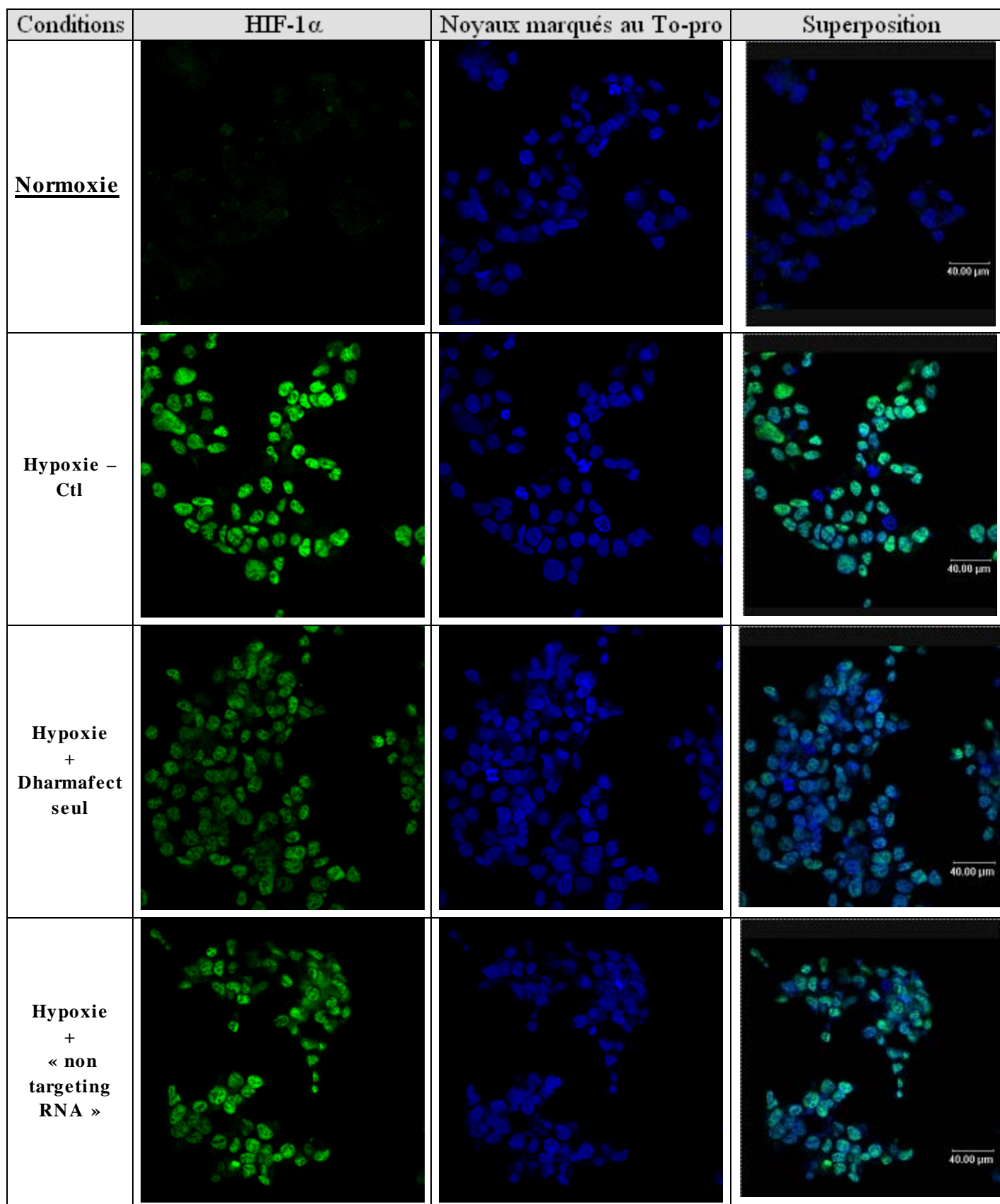
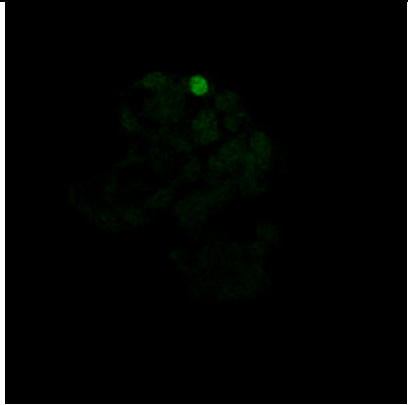
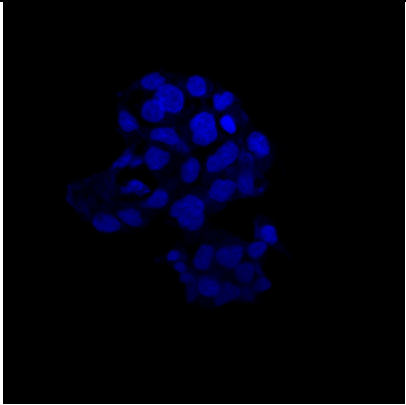
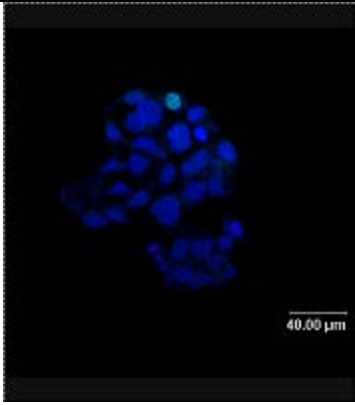
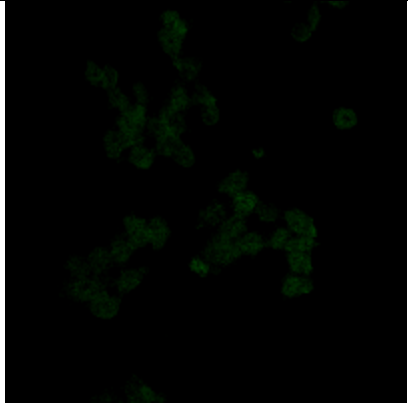
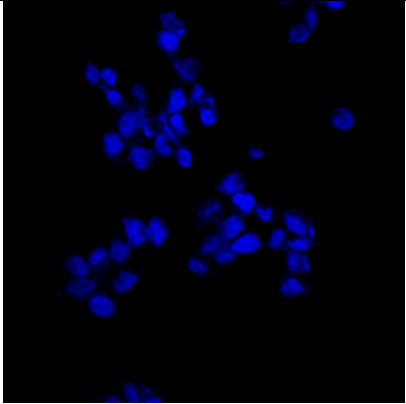
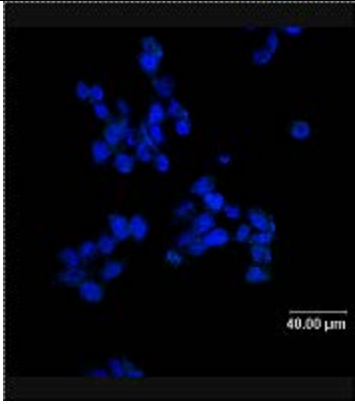
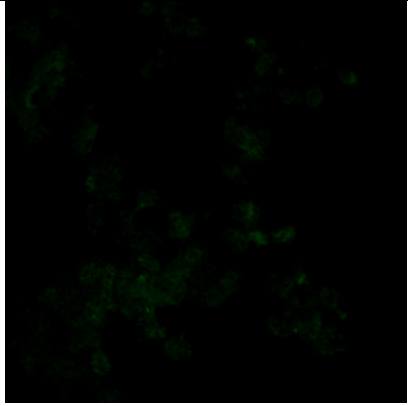
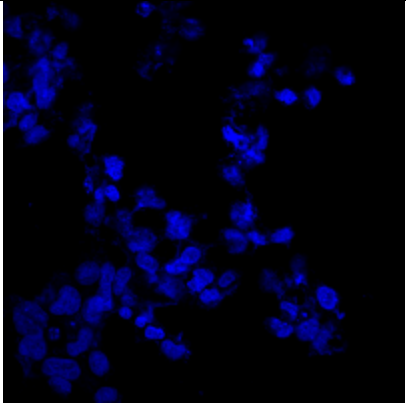
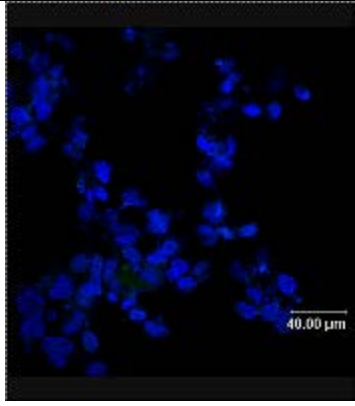
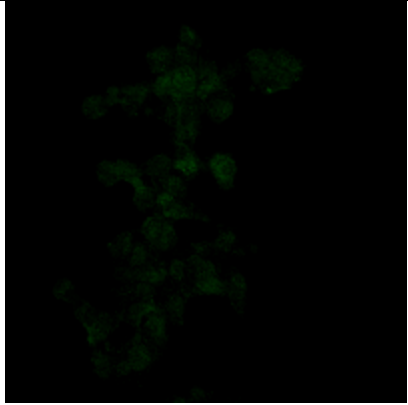
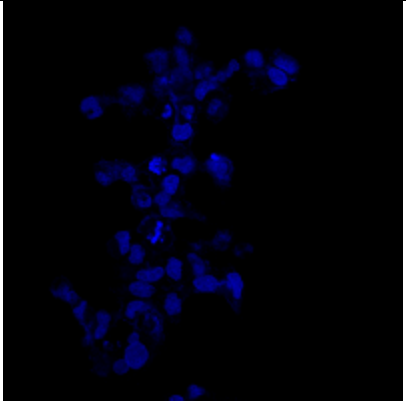
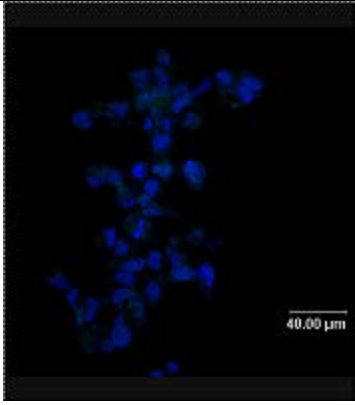


Figure 13 : Effet du smart pool de si-RNA à différentes concentrations sur la quantité protéique de HIF-1 α visualisée par immunofluorescence.

Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits à 100 000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec les si-RNA pour les différentes concentrations durant 24 heures. Elles sont ensuite incubées en hypoxie ou normoxie pendant 5 heures dans du milieu CO₂ indépendant. Au terme de cette incubation, le marquage est réalisé. Toutes les observations sont réalisées au microscope confocal en maintenant le PMT constant.

Conditions	HIF-1 α	Noyaux marqués au To-pro	Superposition
Hypoxie + SiRNA 10 nM			
Hypoxie + SiRNA 20 nM			
Hypoxie + SiRNA 50 nM			
Hypoxie + SiRNA 100 nM			

2.2.1. Effet de différentes concentrations en si-RNA anti HIF-1 α sur l'abondance de la protéine visualisée en immunofluorescence

Le but de cette expérience est d'étudier l'efficacité des si-RNA en fonction de la concentration d'utilisation, ainsi que du délai posttransfection, pour obtenir une diminution de HIF-1 α la plus importante possible.

Un contrôle constitué d'un si-RNA ne ciblant aucun ARNm humain sera utilisé comme contrôle négatif dans toutes les expériences (« non targeting RNA »).

Description de l'expérience

Les HepG2 sont repiquées en plaque 24 puits à 100 000 cellules par puits 24 heures avant la transfection. 4 plaque 24 puits sont réalisées. 2 pour être observées 24 heures après le début de la transfection, et 2 pour être observées 48 heures après le début de la transfection. Pour chaque délai post transfection, il y a une plaque pour la normoxie et une pour l'hypoxie (Ctrl: cellules non transfectées, agent transfectant seul, si-RNA non ciblant, les différentes concentrations en si-RNA). Après 24 heures de repos, les cellules sont transfectées avec les si-RNA aux concentrations suivantes ; 10, 20, 50, et 100 nM, et la transfection se poursuit durant 24 heures. Passé ce délai, les cellules des deux plaques destinées à être observées 24 heures après le début de la transfection sont incubées en hypoxie ou normoxie durant 5 heures avant d'être fixées à la PFA 4%, perméabilisées au PBS + Triton 1% et traitées pour le marquage. Les cellules des deux autres plaques destinées à être observées 48 heures après le début de la transfection ont été placées dans du milieu complet pendant 24 heures. Elles ont ensuite subi le même traitement que les autres. Les noyaux ont été marqués au TO-PRO, et la protéine HIF-1 α reconnue par un anticorps primaire, ensuite ciblé par un anticorps secondaire couplé à de l'Alexa 488.

Analyse des résultats

Les résultats pour les observations réalisées 24 heures après la transfection sont représentés à la figure 13. On observe très peu de HIF-1 α en normoxie alors que l'hypoxie provoque une très forte accumulation de la protéine. La quantité de HIF-1 α est légèrement diminuée dans les cellules ayant été soumises à l'agent transfectant seul. Cela pourrait être dû au stress que cet agent seul induit. Le non targeting RNA n'induit pas de modification de l'abondance protéique de HIF-1 α . A la concentration en si-RNA de 10 nM, on observe une importante diminution de la quantité de HIF-1 α . Cette diminution est assez homogène, et le silencing est de l'ordre de 90%. Il reste malgré tout, ça et là, des cellules qui ne semblent pas avoir été atteintes et pour lesquelles la fluorescence, et donc la quantité de HIF-1 α , demeure importante. Aux concentrations supérieures en si-RNA, le silencing est toujours très important, et plus aucune cellule n'exprime un taux élevé de HIF-1 α . Les si-RNA sont donc très efficaces et offrent un très bon silencing homogène dès de faibles concentrations. Le fait de pouvoir utiliser de faibles concentrations est intéressant, car au delà du fait que cela soit économique, l'éventualité d'induire des réponses non spécifiques est moindre.

Des observations similaires ont été réalisées 48 h après le début de la transfection (résultats non montrés). Cependant après ce délai, les cellules ont eu le temps de se multiplier et semblent avoir souffert d'une densité trop importante, des débris cellulaires sont effectivement visibles.

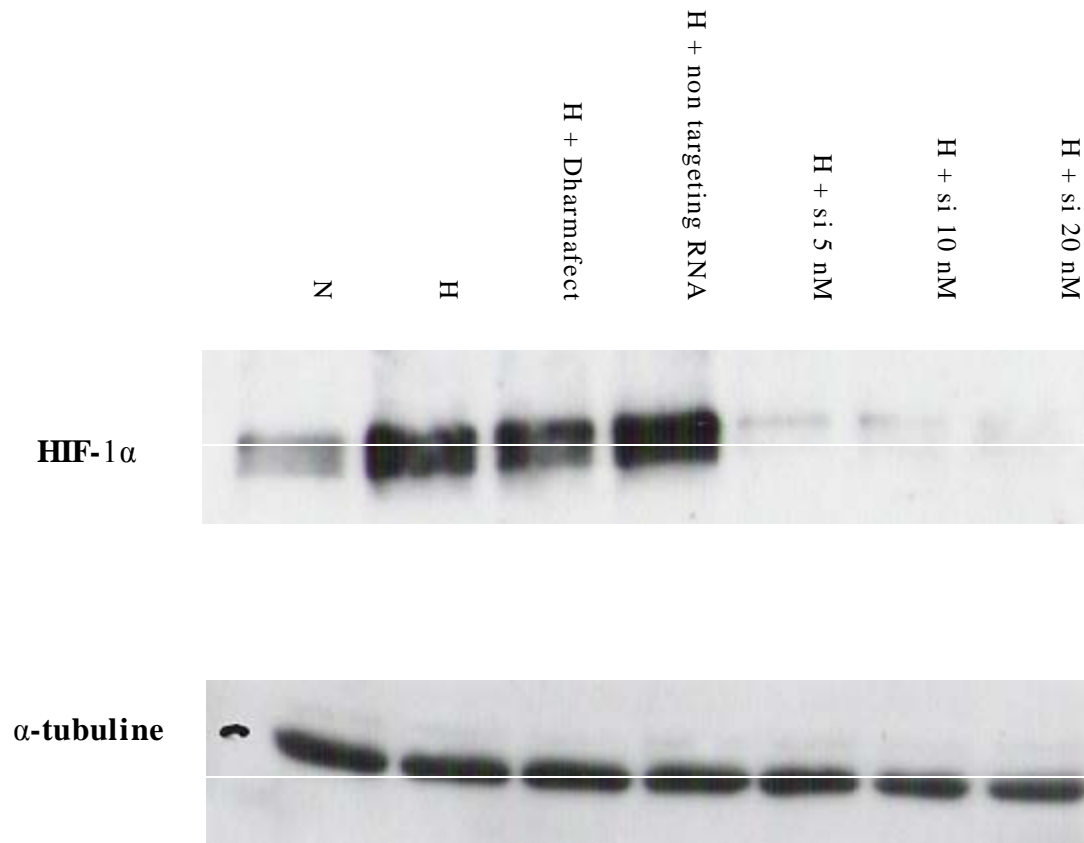


Figure 14 : Effet du Smart pool de si-RNA à différentes concentrations sur la quantité protéique de HIF-1α.

Les cellules ont été repiquées en T25 à 1 200 000 cellules par boîtes 24 heures avant la transfection. Elles ont ensuite été transfectées 24 heures durant avec l'agent transfectant seul, le non targeting RNA, ou les si-RNA anti HIF-1α à différentes concentrations avant d'être incubées en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant pour une durée de 5 heures. Après l'incubation, les extraits totaux sont récoltés, et un western blot est réalisé. HIF-1α et l'α-tubuline sont révélés à l'aide d'anticorps spécifiques. L'α-tubuline sert de contrôle de charge.

2.2.2. Effet de différentes concentrations en si-RNA anti HIF-1 α sur l'abondance de la protéine visualisée par western blot

Pour confirmer l'efficacité des siRNA sur la quantité protéique de HIF-1 α , nous avons réalisé un western blot. Comme cité précédemment, le silencing est aussi bon à 24 qu'à 48 heures après la transfection. Cependant, 48 heures après la transfection, les cellules semblent être moins belles. Pour ces raisons, toutes les expériences qui vont suivre se déroulent 24 heures après le début de la transfection.

Description de l'expérience

Les HepG2 sont repiquées en T25 à 1 200 000 cellules par boîte 24 heures avant la transfection.

Etant donné que les résultats précédents montraient un silencing efficace dès de très faibles concentrations, les concentrations utilisées dans cette expérience s'étalent de 5 à 20 nM. Le lendemain, les cellules devant être transfectées le sont pour les conditions suivantes : si-RNA à 5, 10, et 20 nM, non targeting RNA à 20 nM (correspond à la concentration en si RNA anti HIF-1 α la plus élevée), et agent transfectant seul. Les deux T25 non transfectées correspondent aux conditions contrôles d'hypoxie et de normoxie. La transfection se poursuit durant 24 heures, et le lendemain les cellules sont incubées en hypoxie ou normoxie pendant 5 heures. Des extraits totaux sont ensuite récoltés afin de réaliser le western blot.

Analyse des résultats

Les résultats présentés à la figure 14 montrent qu'en normoxie la quantité de HIF-1 α est faible et qu'elle augmente fortement en hypoxie. L'agent transfectant seul et le non targeting RNA n'ont pas d'effet. Après la transfection avec les siRNA, dès 5 nM, l'abondance de HIF-1 α chute fortement. Elle est en effet déjà plus faible qu'en normoxie. A 10 nM en siRNA, la quantité de HIF-1 α est du même ordre qu'à 5 nM, la différence n'est pas très prononcée. Par contre à 20 nM, on ne détecte pratiquement plus la bande correspondant à HIF-1 α , l'extinction semble être maximale dès cette concentration en siRNA. Le western blot confirme donc l'efficacité des siRNA par rapport à la diminution protéique de HIF-1 α déjà observée dans l'expérience précédente en immunofluorescence. Au vu de ces deux expériences, il semble que la concentration la plus appropriée soit 20 nM. En effet, même si aux concentrations inférieures, l'effet est déjà important, il n'est pas optimal. Et comme les concentrations supérieures à 20 ne semblent pas avoir d'effet plus important, la concentration que nous allons utiliser pour les expériences ultérieures sera de 20 nM.

2.2.3. Effet des si-RNA anti HIF-1 α sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Les résultats des deux expériences précédentes ont montré que les si-RNA sont très efficaces, c'est-à-dire qu'ils engendrent une diminution de plus de 90 % de l'abondance de la protéine HIF-1 α . Normalement, si HIF-1 α n'est pas présent, le facteur HIF ne peut plus se former, et il ne peut donc plus être transcriptionnellement actif. Afin de vérifier les répercussions du silencing de HIF-1 α suite à la transfection des si-RNA sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1, nous avons utilisé un système rapporteur.

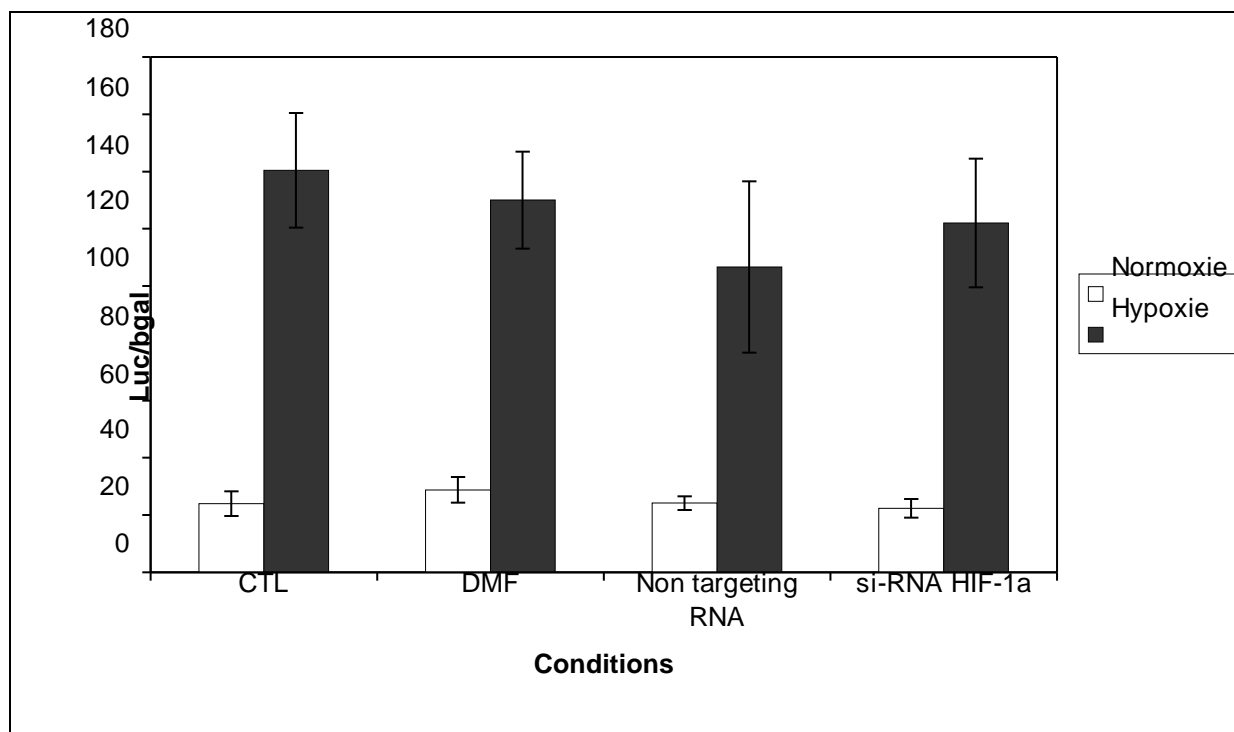


Figure 15 : Effet du Smart pool de si-RNA sur l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 visualisée par système rapporteur.

Les cellules ont été repiquées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits 24 heures avant la première transfection. Suite à la première transfection de 6 heures avec le système rapporteur, les cellules ont été lavées deux fois au PBS puis transfectées durant 24 heures avec les si-RNA pour différentes conditions (si-RNA 20 nM, non targeting RNA 20 nM, et agent transfectant seul). Elles ont ensuite été incubées en hypoxie ou normoxie pendant 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant. Les résultats sont exprimés en tant que rapport de l'activité luciférase sur l'activité β -galactosidase (moyenne \pm 1 écart type, n=3).

Description de l' expérience

Le système rapporteur utilisé est identique à celui employé pour étudier l' effet de l' échinomycine sur l' activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules ont été repiquées à 50 000 cellules par puits 24 heures avant la première transfection, celle du système rapporteur qui a duré 6 heures. Suite à cette première transfection, elles ont été lavées deux fois au PBS, puis transfectées pour les conditions suivantes avec les si-RNA : si-RNA 20 nM, non targeting RNA à 20 nM, et agent transfectant seul (DMF=Dharmafect n°1) pendant 24 heures. Elles ont enfin été incubées en hypoxie ou normoxie pour une durée de 16 heures avant d' être lysées pour les mesures des activités luciférase et β -galactosidase. Chaque condition est effectuée en triple.

Analyse des résultats

Les résultats sont représentés graphiquement à la figure 15. On remarque qu' en normoxie l' activité est faible, mais que par contre, en hypoxie elle est importante. Les observations indiquent que la transfection du système rapporteur a bien fonctionné et que l' hypoxie a bien exercé son effet. Quelle que soit la condition (CTL, DMF, non targeting RNA, si-RNA) le profil demeure identique, ce qui signifie que les si-RNA n' ont pas affecté l' activité transcriptionnelle de HIF-1. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces observations inattendues :

- la transfection avec les si-RNA n' a pas fonctionné. C' est plausible, contaminer les si-RNA à la RNase durant la transfection est possible.
- la densité de 50 000 cellules par puits pour la transfection du système rapporteur ne convient pas à celle recommandée pour les si-RNA qui est de 100 000 cellules par puits et pour laquelle une inhibition de l' expression de HIF1 α était observée dans les expériences précédentes.
- les deux transfactions s' enchaînant sont peut être tellement stressantes que les cellules répondent de façon aberrante, et il faudrait laisser un temps de repos entre les deux transfactions.
- les transfactions sont incompatibles et il y a des interactions « bizarres » entre les deux agents transfectants. Inverser l' ordre des transfactions améliorerait peut-être les résultats.

Nous avons testé expérimentalement chacune des hypothèses.

- Pour voir si la confluence des cellules pouvait avoir un impact sur l' efficacité de transfection des si-RNA, nous avons réalisé une immunofluorescence avec des transfactions aux densités de 50 000 et 100 000 cellules par puits. Les résultats (non montrés) indiquent qu' elle influe peu, et le silencing était aussi efficace que les cellules soientensemencées à 50 000 ou à 100 000 cellules par puits.
- Nous avons inversé l' ordre des transfactions et accordé un jour de repos aux cellules entre les deux. Toutes ces modifications n'ont rien changé et le profil des résultats obtenus était toujours identique, c' est-à-dire que les si-RNA n' influencent pas l' augmentation de l' expression de la luciférase en hypoxie.

Deux hypothèses s'avèrent pour le moment plausibles:

- 1) cette double transfection perturbe énormément les cellules, et les deux agents transfectants pourraient interférer. Il serait dès lors intéressant d'effectuer d'autres expériences afin d'avoir une mesure de l'efficacité des siRNA au niveau de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. On aurait par exemple pu suivre l'expression de gènes cibles de HIF-1 par PCR en temps réel. Cependant, dans le contexte de ce mémoire, le temps est un facteur limitant et ces expériences n'ont pas pu être réalisées.
- 2) L'activité de HIF-1 est bien diminuée mais est compensée par une sur-activation de HIF-2. Cet effet compensateur a déjà été observé dans d'autres conditions (Ravalet *al.*, 2005). Cette hypothèse reste également à être vérifiée.

A ce stade du travail, nous avons considéré ce système d'inhibition de l'expression de HIF-1 α comme efficace et décidé de l'utiliser pour tenter de comprendre l'implication du facteur HIF-1 dans la protection apoptotique en hypoxie. En effet, il y a peu de chances pour que le western et l'immunofluorescence aient tous les deux donné des résultats biaisés. Nous avons en effet observé un silencing de plus de 90 % de l'expression de HIF-1 α en hypoxie. De plus, pour être commercialisés, les si-RNA doivent subir une batterie de tests garantissant leur efficacité et leur spécificité.

3. Etude de l'implication du facteur de transcription HIF1 dans la protection contre l'apoptose en hypoxie

Nous disposons maintenant d'un système d'inhibition efficace et normalement spécifique, (bien que, par manque de temps, nous n'avons pas pu tester la spécificité) dont nous connaissons les conditions optimales d'utilisation. Nous pouvons dès lors l'utiliser pour mettre en évidence l'éventuelle implication du facteur de transcription HIF-1 dans la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie dans les HepG2. Pour ce faire nous avons inhibé le facteur HIF-1 en inhibant l'expression de sa sous-unité HIF-1 α par transfection des cellules avec des si-RNA, et étudié les répercussions de cette inhibition sur l'apoptose. Pour rappel, les expériences réalisées au laboratoire avaient montré que l'hypoxie inhibait l'apoptose induite par étoposide dans les cellules HepG2. Nous avons ensuite utilisé plusieurs approches pour étudier leurs réponses au stress pro-apoptotique que constitue l'étoposide et voir l'influence de l'inhibition de HIF1 sur celle-ci. Deux approches « protéiques » vont être utilisées pour suivre l'apoptose des cellules: l'une permettant de rendre compte du clivage PARP dans les différentes conditions, l'autre permettant de quantifier l'activité de la caspase 3. Ensuite nous étudierons la réponse globale des cellules au niveau transcriptionnel en utilisant un micro damier à ADN « Dualchip Human Apoptosis » qui permet d'étudier la variation d'expression de 123 messages de gènes dont les produits sont impliqués dans le processus d'apoptose.

3.1. Etude de l'apoptose

3.1.1. Suivi du clivage de PARP

PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) est une protéine 116 kDa intervenant dans la réparation de l'ADN. Lorsque le processus d'apoptose est déclenché, la réparation de l'ADN coûteuse en énergie n'a plus de sens, et PARP est inactivé par les caspases effectrices. Celles-ci vont le cliver en deux fragments de ~ 85 et ~ 24 kDa. La présence de PARP clivé est une

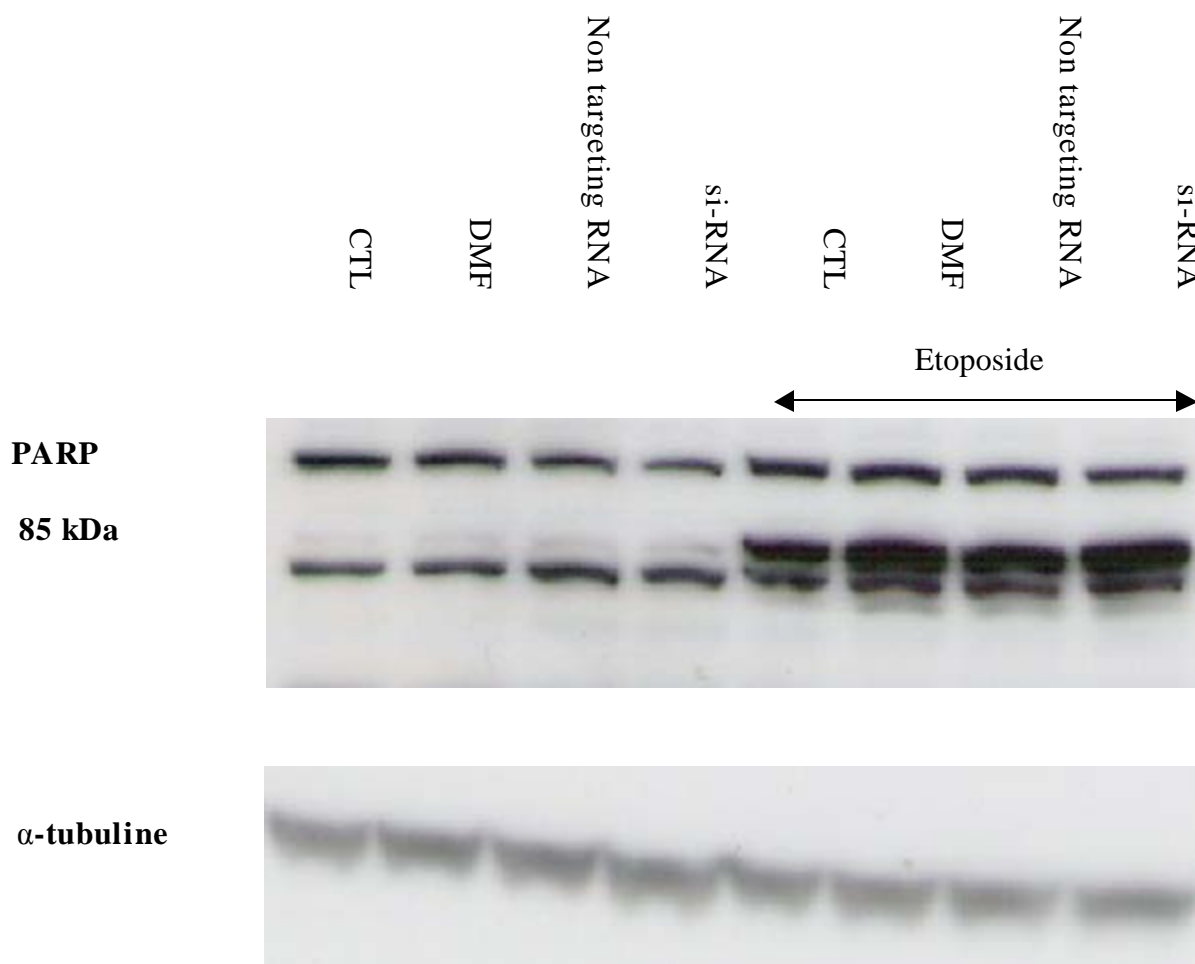


Figure 16 : Effet de la dégradation du messager de HIF-1 α par si-RNA sur le clivage de PARP induit par l' étoposide.

Les HepG2 ont été repiquées en T25 à 1 200 000 par boîte 24 heures avant la transfection. Elles ont ensuite été transfectées durant 24 heures avec le si-RNA, le non targeting RNA, ou l' agent transfectant seul avant d' être incubées pour 16 heures emormoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' étoposide à une concentration de 50 μ M. Les extraits totaux sont ensuite récoltés et le western blot est réalisé. PARP et l' α -tubuline sont révélés à l' aide d' anticorps spécifiques. L α -tubuline fait office de contrôle de charge. Toutes les conditions représentées ci-dessus concernent la normoxie uniquement. CTL, contrôle, dans ce cas normoxie ; et DMF, Dharmafect, agent transfectant seul.

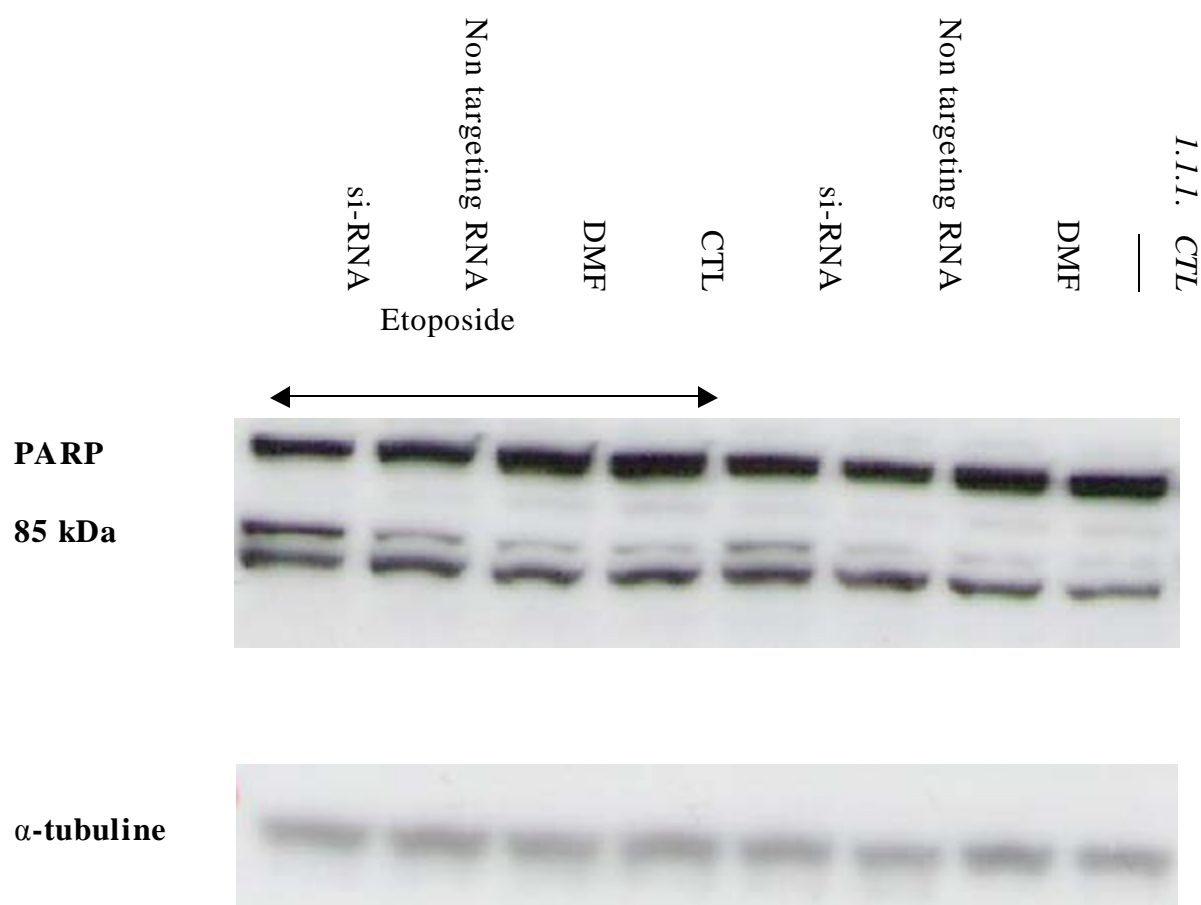


Figure 16 bis : Effet de la dégradation du messager de HIF-1 α par si-RNA sur le clivage de PARP induit par l' étoposide.

Les HepG2 ont été repiquées en T25 à 1 200 000 par boîte 24 heures avant la transfection. Elles ont ensuite été transfectées 24 heures durant avec le si-RNA, le non targeting RNA, ou l' agent transfectant seul avant d' être incubées pour 16 heures erhypoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' étoposide à une concentration de 50 μ M. Les extraits totaux sont ensuite récoltés et le western blot est réalisé. PARP et l' α -tubuline sont révélés à l' aide d' anticorps spécifiques. L' α -tubuline fait office de contrôle de charge. Toutes les conditions représentées ci-dessus concernent l' hypoxie uniquement. CTL, contrôle, dans ce cas hypoxie ; et DMF, Dharmafect, agent transfectant seul.

caractéristique typique des cellules en apoptose, et en déterminer l'abondance dans des extraits cellulaires est un bon moyen de mettre en évidence le phénomène d'apoptose au sein d'une population cellulaire. Nous avons donc réalisé un western blot mettant en évidence PARP ainsi que son fragment de 85 kDa issu de son clivage par les caspases. Donc, si HIF-1 est impliqué dans la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie dans les HepG2, les cellules transfectées avec les si-RNA anti HIF-1 α devraient contenir plus de PARP clivé que les cellules non transfectées après l'incubation sous hypoxie en présence d'étoposide.

Description de l'expérience

Les HepG2 ont été repiquées en 16 T25 à 1 200 000 cellules par boîte 24 heures avant la transfection. Les cellules devant être transfectées le sont ensuite pendant 24 heures pour chacune des conditions suivantes : si-RNA 20 nM, non targeting RNA 20 nM et agent transfectant seul. Elles sont ensuite incubées en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant comprenant ou non de l'étoposide à une concentration de 50 μ M durant 16 heures. Les extraits protéiques totaux sont ensuite collectés pour la réalisation du western blot.

Analyse des résultats

Les résultats présentés aux figures 16 et 16 bis montrent qu'en normoxie, l'incubation en présence d'étoposide provoque un important clivage de PARP qui se traduit par une abondance conséquente du fragment de 85 kDa. Par contre, pour ces mêmes conditions en l'absence d'étoposide le fragment de PARP est à peine détecté. Cependant, il semble qu'il y en ait un peu plus pour les cellules transfectées (DMF, si-RNA, et Non targeting RNA), et particulièrement celles transfectées avec les si-RNA. En hypoxie en l'absence d'étoposide, comme pour la normoxie, le fragment de PARP est à peine perceptible pour la condition contrôle. Par contre, avec la transfection il semble être légèrement plus abondant. Pour les cellules transfectées avec les si-RNA anti HIF-1 α le fragment de PARP clivé devient bien plus abondant, et la bande est nettement visible. Ces résultats suggèrent que les cellules dépourvues de HIF-1 fonctionnel supportent moins bien le stress de l'hypoxie et qu'une partie d'entre elles entre en apoptose. En hypoxie et en présence d'étoposide, on remarque que pour le contrôle, la quantité de PARP clivé est fortement inférieure à celle observée pour la même conditions en normoxie. On peut donc ici bien voir l'effet protecteur de l'hypoxie par rapport à l'apoptose. Pour les cellules transfectées avec le non targeting RNA et l'agent transfectant seul, la quantité du fragment de PARP semble légèrement augmenter. Dans ce cas-ci, le stress de la transfection a pu agir de concours avec l'étoposide pour favoriser l'induction de l'apoptose. Pour les cellules transfectées avec les siRNA, la quantité du fragment de 85 kDa de PARP augmente fortement. Même si elle n'est pas encore aussi importante que celle observée dans la condition normoxie + étoposide, elle est nettement plus importante que pour la conditions hypoxie + étoposide. Cela signifie que l'inhibition de HIF1 lève en partie la protection apoptotique en hypoxie. Ces résultats, suggèrent donc que HIF-1 participe au moins en partie à la protection apportée par l'hypoxie.

3.1.2. Mesure de l'activité de la caspase 3

Dans le but de confirmer ces résultats suggérant un rôle de HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie, nous avons réalisé une seconde expérience. Il s'agit d'une mesure de l'activité de la caspase 3. Celle-ci est une caspase effectrice qui, suite à son activation lors du

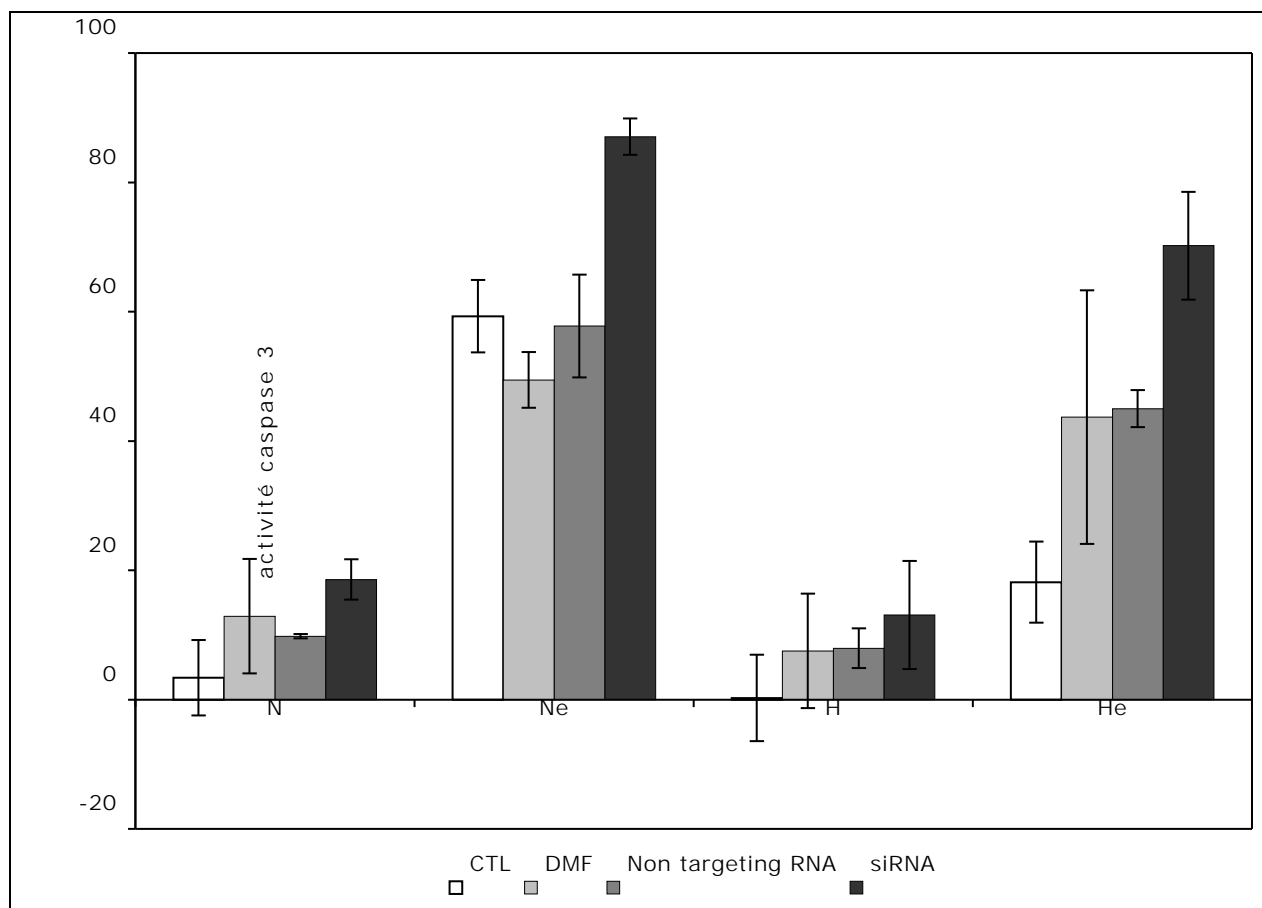


Figure 17 : Effet de la dégradation du messenger de HIF-1 α par les si-RNA sur l'activité caspase 3 induite par l' étoposide

24 heures avant la transfection, les cellules ont été repiquées en plaque 6 puits à raison de 250 000 cellules par puits. Elles ont ensuite été transfectées pour les conditions suivantes : si-RNA 20 nM, non targeting RNA 20 nM, agent transfectant seul durant 24 heures. Des cellules non transfectées servent de contrôle. Les cellules ont ensuite été incubées en hypoxie ou normoxie dans du milieu CO₂ indépendant en présence ou absence d' étoposide à une concentration de 50 μ M pendant 16 heures. Les cellules ont ensuite été lysées pour le dosage de l' activité caspase 3. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm 1 écart type (n= 3).

déclenchement de l'apoptose, va cliver toute une série de substrats cellulaires menant au phénotype apoptotique. Son activité, tout comme la quantité de PARP clivé, peut être mesurée facilement et est un bon indicateur du déclenchement de l'apoptose en réponse à des stress tel celui induit par l'étoposide. En mesurant la différence d'activité de cette caspase entre des cellules transfectées avec des si-RNA incubées sous hypoxie en présence d'étoposide, et des cellules non transfectées exposées aux mêmes conditions, on devrait observer une activité accrue chez les cellules transfectées. La mesure de l'activité de cette caspase se fait par utilisation d'un substrat artificiel de celle-ci qui, une fois clivé, devient fluorescent à 505 nm après avoir été excité à 400 nm.

Description de l'expérience

Les cellules ont été repiquées en plaque 6 puits à 250 000 cellules par puits 24 heures avant la transfection. Les cellules sont ensuite transfectées pendant 24 heures pour les conditions suivantes, si-RNA 20 nM, non targeting RNA, et agent transfectant seul. Des cellules non transfectées servent de contrôle. Chaque condition est réalisée en triple (vrais triples). La transfection terminée, les cellules sont incubées en hypoxie ou normoxie durant 16 heures en présence ou absence d'étoposide à une concentration de 50 μ M. Les extraits sont ensuite réalisés pour la mesure de l'activité de la caspase 3.

Analyse des résultats

Les résultats présentés graphiquement à la figure 17 indiquent qu'en normoxie en l'absence d'étoposide, l'activité caspase est faible. La transfection quelle qu'elle soit, l'accroît légèrement, probablement parce que le stress que celle-ci représente fragilise certaines cellules. En normoxie en présence d'étoposide, quelle que soit la condition, on observe une induction importante de l'apoptose se traduisant par une activité caspase 3 grandement accrue. L'activité est particulièrement importante pour les cellules transfectées avec les si-RNA, indiquant un rôle protecteur de HIF-1. Une observation similaire avait été faite lors du suivi du clivage de PARP par western blot. HIF-1, bien que très peu présent dans cette condition, joue peut-être déjà un rôle protecteur en normoxie et la dégradation du messager de sa sous-unité HIF-1 α l'empêcherait d'agir. En hypoxie, en l'absence d'étoposide, l'activité de la caspase 3 est faible. Elle est cependant, comme en normoxie, plus élevée pour les cellules transfectées d'avantage stressées. En hypoxie, en présence d'étoposide, l'activité de la caspase 3 est bien moindre pour la condition contrôle (non transfectée), que celle observée dans les mêmes conditions en normoxie. Ceci illustre une fois de plus la protection contre l'apoptose apportée par l'hypoxie. L'activité de la caspase 3 est accrue pour les conditions non targeting RNA et agent transfectant seul. Cela signifie que la protection apportée par l'hypoxie serait en partie levée par la transfection en elle-même, ou encore que le stress de la transfection, ou l'agent transfectant agirait de manière synergique avec l'étoposide pour donner des effets que l'hypoxie ne pourrait plus contrer. Dans les cellules transfectées avec les si-RNA, l'activité caspase 3 est très importante, ce qui signifie que HIF1 a bel et bien un effet protecteur sur les cellules, et que son incapacitation lève cette protection. L'activité caspase 3 dans cette condition est même supérieure à celle observée pour la condition normoxie + étoposide. Un effet similaire avait déjà été observé en suivant le clivage de PARP par western blot.

3.2. Approche transcriptomique

Les résultats obtenus au cours de ces deux expériences indiquent clairement que HIF-1 joue un rôle dans la protection contre l'apoptose induite par l'étoposide chez les HepG2 en hypoxie. Pour tenter de comprendre comment HIF-1 est impliqué dans cette protection, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques sur damiers. Le damier utilisé est la « Dualchip Human Apoptosis » qui reprend des sondes pour la détection de 123 gènes dont les produits sont impliqués dans le processus d'apoptose. Ces damiers nous permettent de suivre le profil d'expression de ces gènes en fonction des conditions, et ainsi d'étudier l'influence de l'inhibition de HIF-1 sur ces profils.

3.2.1. L'apoptochip

Description de l'expérience

Les cellules sont repiquées en T75 à 3 000 000 de cellules par boîtes 24 heures avant la transfection. Elles sont ensuite transfectées avec les si-RNA pour les conditions suivantes si-RNA 20 nM et non targeting RNA 20 nM pendant 24 heures. La transfection terminée, elles sont incubées durant 16 heures dans du milieu CO₂ indépendant comprenant ou non de l'étoposide à une concentration de 50 µM. En fin de cette incubation, l'ARN total est extrait, puis rétro-transcrit ADNc comportant des cytosines biotinylées. L'ADNc biotinylé est ensuite hybridé sur les micro damiers. L'hybridation terminée, les lames sont scannées et l'intensité des différents spots quantifiée. Les données obtenues sont ensuite traitées en tenant compte des contrôles positifs et négatifs d'hybridation, de rétro-transcription, et de l'expression des « house keeping genes », ce qui permet finalement d'obtenir pour les différentes conditions des rapports d'expression par rapport à la condition contrôle, exprimés en « fold induction ».

Analyse des résultats

Pour les 7 conditions analysées par rapport à la condition contrôle normoxie, 40 des 123 gènes repris par le damier voient leur expression changer significativement dans au moins une des conditions. Ces résultats sont repris dans le tableau 2.

Gènes induits par l'hypoxie

Les résultats figurant dans le tableau 2 indiquent que BNIP3 qui est un gène cible de HIF-1 (Greijer *et al.*, 2004) codant pour une protéine pro-apoptotique, voit son expression fortement induite en hypoxie (4,94 x plus abondant qu'en normoxie). La quantité de son transcrite est beaucoup plus faible et est du même ordre qu'en normoxie pour toutes les conditions où les cellules ont été mises en présence d'étoposide et/ou transfectées avec le non targeting RNA. Lorsque les cellules sont transfectées avec les si-RNA et incubées sous hypoxie, l'abondance de BNIP3 chute fortement et ce en présence comme en absence d'étoposide (respectivement 35 et 24 % de son abondance en normoxie). Cette observation indique que son expression est fortement dépendante de HIF-1, et qu'en l'absence de celui-ci sa transcription est grandement réduite. Un autre gène cible de HIF-1 mais codant cette fois pour une protéine anti-apoptotique voit également son expression induite en hypoxie, il s'agit de Mcl1 (1,77 x plus abondant qu'en normoxie). L'étoposide en normoxie est également capable d'en augmenter le message et ce via l'activation d'un autre facteur de transcription (A. Sermeus, mémoire de licence 2005). Dans ce cas, au contraire de BNIP3, l'induction de l'expression de ce gène n'est pas diminuée par les siRNA, que ce soit en présence comme en absence d'étoposide.

	N et	H	H et	HntRNA	HntRNA et	Hsi	Hsi et
AKT1	1,23	0,89	0,50	0,57	0,32	0,56	0,71
BAG1	1,50	1,63					2,05
BAK 1	2,46						1,69
BAX	1,55	0,76	0,55	0,60	0,82	0,59	0,95
BclX	0,88	1,00	0,58	0,61	0,48	0,83	0,76
BIRC5	0,70	0,57	0,26	0,57	0,11	0,40	0,28
BNIP3	1,40	4,94	1,40	1,20	1,55	0,24	0,35
CASP4	0,64						
CASP8	0,90		3,21	0,42	0,83	0,63	0,77
CCND1	0,88	0,89	0,27	0,29	0,36	0,26	0,44
CCNH	0,48	1,53					
CDK2	0,55		0,06	0,34	0,01	0,38	0,50
CDK4	0,34	0,86	0,36	0,82	0,42	0,78	0,66
CDK7	0,59	1,43	0,44	0,41	0,30	0,36	0,59
CDKN1A	1,50	0,56	0,59	0,26	0,80	0,45	1,13
CLU	0,48	0,64	0,11	0,26	0,07		0,29
CSE1L	0,39	1,28	0,22	0,29	0,28	0,26	0,26
DFFA	1,06		0,34	0,55	0,09	0,61	0,78
E2F 1	0,47	0,35	0,30	0,38	0,17	0,08	0,41
FADD	0,85			0,55	0,38	0,62	0,79
GADD45A	1,22	0,82	0,65	0,39	0,60	0,56	1,18
GPX1	1,71	0,51	0,36	0,74	1,28	0,65	1,12
GRB2	0,69	0,91	0,36	0,52	0,30	0,51	0,57
GSR	0,36	1,08	0,32	0,59	0,18	0,48	0,46
GSTT1	0,94	0,82	0,54	0,45		0,47	0,64
IGF2	1,12	2,63	0,66	0,72	0,85	0,70	0,72
IGF2R	0,66	1,34	0,74	0,53	0,72	0,89	0,94
IGFBP2		1,91					
IGFBP4	1,63					1,69	2,58
IGFBP6						1,72	
MAP2K1	0,96	1,75	0,50	0,70	0,66	0,80	0,97
MCL1	1,57	1,77	1,01	0,79	1,35	1,82	2,86
MDM2	2,00		2,25		2,00		
MGST1	0,70	0,50	0,45	0,44	0,31	0,44	0,53
PCNA	1,69	1,11	0,65	0,29	0,53	0,23	0,81
PLK	0,56	1,92	0,19	0,36	0,08	0,41	0,17
RAF1	0,59	2,10	0,08	0,35	0,08	0,49	0,47
TFDP1	0,52	1,95	0,31	0,26	0,24	0,25	0,24
TNFRSF10A	1,36	1,93	1,73	0,58	0,86	0,67	0,69
TNFRSF10B	0,91	2,07	0,47	0,37	0,15	0,75	
TNFRSF1A				0,63			

Tableau 2 : Variation de l' expression de certains gènes en présence ou absence d' étoposide en hypoxie ou normoxie sur des cellules transfectées ou non avec des si-RNA anti HIF-1α.

Les valeurs inférieures à 1 représentent une sous expression tandis que les valeurs supérieures à 1 une sur expression du gène par rapport à la condition de référence, dans ce cas, la normoxie.

Cases en jaune : données quantitatives significatives, cases en vert : données qualitatives significatives, valeurs inscrites en vert : données non significatives, cases vides : non détecté.

Les conditions sont : N et : normoxie étoposide ; H : hypoxie ; H et : hypoxie étoposide ; HntRNA : hypoxie non targeting RNA ; HntRNA et : hypoxie non targeting RNA étoposide ; Hsi : hypoxie si-RNA ; Hsi et : hypoxie si-RNA étoposide.

Cela signifie que bien que pouvant être induit par HIF-1, la transcription de ce gène peut être initiée d'autres façons, car l'incapacitation de HIF-1 n'empêche pas de générer une grande quantité de messenger. Nous supposons que Mcl-1 bien connu pour son effet protecteur pourrait donc participer à une protection indépendante de HIF-1 en hypoxie.

Gènes induits par l'étoposide

L'étoposide va provoquer des cassures double brin dans l'ADN, ce qui va mener à l'activation de p53. Celui-ci pourra alors induire l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dégâts à l'ADN, et l'apoptose. Parmi les gènes cibles de p53, quelques uns sont détectables sur le damier et voient leur expression augmenter en présence d'étoposide. Ainsi, PCNA, CDKN1A, Bak, Bax, Gpx1 et MDM2 voient tous l'abondance de leur messenger accrue dans les cellules incubées en normoxie en présence d'étoposide. MDM2 est présent en abondance dans toutes les cellules incubées en présence d'étoposide sauf dans celles transfectées avec les siRNA. Gpx1 (Glutathion Peroxydase), n'est fortement induit qu'en normoxie en présence d'étoposide, tout comme PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Bax, et CDKN1A (Cyclin Dependent Kinase inhibitor 1A = gène encodant p21). Pour toutes les conditions d'hypoxie, les transcrits de l'ensemble de ces gènes sont beaucoup moins abondants et l'incapacitation de HIF-1 n'influence pas cette diminution observée en hypoxie. Bak est fortement transcrit en normoxie en présence d'étoposide, et n'est plus détecté pour les conditions d'hypoxie en présence ou absence d'étoposide. Par contre pour les cellules transfectées avec les si-RNA, et incubées sous hypoxie en présence d'étoposide, l'abondance de son transcrit est qualitativement et significativement plus élevée. Ce résultat indique que l'hypoxie inhibe l'augmentation de l'expression de Bak induite par l'étoposide et que HIF-1 pourrait être impliqué dans cette inhibition, puisqu'elle est levée quand HIF-1 est incapacité.

3.2.2. Confirmation des résultats par real time PCR

Dans le but de confirmer les observations obtenues avec la DualChip Human Apoptosis par une autre méthode, nous avons effectué une PCR en temps réel pour quelques gènes du damier pour lesquels nous possédions des amorces spécifiques. La PCR a utilisé comme matrice de l'ADNc provenant d'une rétrotranscription effectuée à partir de l'ARN total des mêmes échantillons que ceux qui ont été utilisés pour les hybridations sur damier. Elle a été effectuée pour les gènes suivants : Mcl-1, Gpx1, CDKN1A, Bak et BNIP3.

De manière générale, on remarque que les effets inducteurs de l'étoposide ainsi que ceux inducteurs ou répresseurs de l'hypoxie observés à l'aide du micro damier sont confirmés par les mesures effectuées en real time PCR. Les effets combinés de l'hypoxie et de l'étoposide ainsi que ceux de la transfection du si-RNA anti HIF-1 α sont également généralement confirmés si ce n'est quelques valeurs pour p21 et une valeur pour Gpx1. Les résultats ainsi que le fait qu'on retrouve bien les effets attendus sur l'expression des gènes cibles de HIF1 et de p53 suggèrent que les résultats obtenus à l'aide de Dualchip Human Apoptosis sont valides. Nous sommes toutefois conscients qu'ils devront être confirmés par la suite en réalisant des vrais triples d'expérience.

3.3. Conclusion

Par les mesures d'activité caspase 3 ainsi qu'en utilisant un western blot révélant le fragment de 85 kDa de PARP, nous avons mis en évidence un effet très net de HIF-1 sur la protection

	N et		H et		HntRNA et		Hsi et	
	Chips	PCR	Chips	PCR	Chips	PCR	Chips	PCR
Bak	2,46	2,027		0,97		2,14	1,69	1,777
Gpx1	1,71	1,91	0,36	0,87	1,28	2,48	1,12	1,46
Mcl-1	1,57	1,46	1,01	2,18	1,35	2,28	2,86	3,3
p21	1,5	2,21	0,59	2,37	0,8	2,34	1,13	1,95
BNIP3	1,4	0,89	1,4	2,64			0,35	0,61

	H		HntRNA		Hsi	
	Chips	PCR	Chips	PCR	Chips	PCR
Bak		0,71		1,51		1,49
Gpx1	0,51	0,79	0,74	2,37	0,65	1,67
Mcl-1	1,77	1,55	0,79	2,211	1,82	3,28
p21	0,56	0,43	0,26	0,97	0,45	1,23
BNIP3	4,94	2,89	1,2	4,85	0,24	0,74

Tableaux 3 : Comparaison de la variation d' expression de 5 gènes mesurée par real time PCR et avec l' apoptochip dans les différentes conditions expérimentales.

Le code couleur est identique à celui utilisé pour le tableau précédent.

apoptotique en hypoxie. Ainsi, nous avons remarqué que lorsque ce facteur était inactivé par la dégradation du messenger de sa sous-unité HIF-1 α , les cellules soumises à une incubation sous hypoxie en présence d' étoposide perdaient en partie la protection. Nous avons de plus remarqué que dans un des tests, la protection n' était pas totalement perdue, mais en partie levée, suggérant qu' un autre mécanisme indépendant de HIF-1 peut aussi intervenir. Pour comprendre ce qui se passait au niveau transcriptionnel, nous avons utilisé des « Apoptochips » qui permettent d' obtenir le profil transcriptionnel de 123 gènes impliqués dans le processus d' apoptose. Ceux-ci nous ont donné des informations permettant de penser que l' hypoxie protégerait de l' apoptose par des voies dépendantes et indépendantes de HIF-1. Ainsi, le messenger de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 continue d' être abondamment transcrit, même en l' absence de HIF-1. De plus, les taux de transcription sont dans ce cas-là plus élevés que ceux obtenus lorsque HIF-1 est fonctionnel. Cette protéine pourrait donc en hypoxie, être fortement induite indépendamment de HIF-1 et jouer un rôle dans la protection. Le gène de la protéine pro-apoptotique Bak est lui fortement transcrit en normoxie en présence d' étoposide, mais n' est plus détecté pour les conditions d' hypoxie, que les incubations aient eu lieu en présence ou en absence d' étoposide. Il est uniquement présent à un taux significativement et qualitativement plus élevé dans les cellules transfectées avec les si-RNA et incubées en présence d' étoposide sous hypoxie. Cela permet de penser que ce gène pro-apoptotique induit par p53 peut, dans des conditions d' hypoxie, voir sa transcription réduite d' une manière dépendante de HIF-1.

On peut supposer que la protection que l' on a observée en hypoxie lors de la mesure de l' activité de la caspase 3 et du western illustrant le clivage de PARP passerait au moins en partie par une activité de HIF-1 régulant l' expression de Bak.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Les cellules d'un organisme peuvent se trouver en situation d'hypoxie dans des conditions normales comme pathologiques. Dans les deux cas, le facteur de transcription HIF-1 sera activé et par l'ensemble des gènes dont il induit la transcription, il offrira aux cellules des réponses adaptatives destinées à faire face à ces conditions contraignantes. Parmi les gènes qui sont induits par ce facteur, certains sont impliqués dans la modulation du processus d'apoptose.

L'hypoxie peut déclencher l'apoptose comme en protéger, et HIF1 induit l'expression de gènes pro-et anti-apoptotiques. A l'heure actuelle, il semble que ce soient la durée et la sévérité de l'hypoxie qui déterminent l'issue finale. Ainsi, une hypoxie sévère entraînerait l'apoptose alors qu'une hypoxie modérée en protégerait. Dans le contexte de maladies comme le cancer, il semble qu'en plus d'apporter toute une série d'avantages aux cellules tumorales, l'hypoxie accroisse également leur résistance à l'apoptose, engendrant une résistance aux agents utilisés dans les chimiothérapies. Il est donc essentiel d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à cette résistance afin de concevoir des nouveaux traitements plus efficaces. C'est dans ce contexte que se situent les travaux réalisés au cours de ce mémoire.

Au laboratoire, il a été précédemment montré que l'hypoxie pouvait protéger les cellules de la lignée HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide, l'absence de signaux de survie, ou un stress oxydatif (Piret *et al.*, 2004). Cependant, le mécanisme par lequel l'hypoxie exerce son effet protecteur n'est pas connu. Nous nous sommes alors demandés si le facteur de transcription HIF-1 était impliqué au moins en partie dans cette protection. Le but de ce travail était donc d'étudier le rôle de HIF-1 dans la protection apportée par l'hypoxie de l'apoptose induite par l'étoposide, un agent utilisé en clinique dans les chimiothérapies.

La première partie du travail consistait en la mise au point d'un système d'inhibition de HIF1 efficace et spécifique. Pour induire une inhibition de HIF-1, nous avons envisagé deux approches différentes. L'une consistait en l'utilisation d'un inhibiteur chimique de HIF-1 capable d'empêcher sa liaison à l'ADN, l'autre étant l'utilisation de siRNA anti HIF-1 α d'un genre nouveau capable d'un silencing important.

Nous avons d'abord testé l'inhibiteur chimique l'échinomycine, molécule capable de se lover dans le petit sillon de l'ADN au niveau de la séquence CGTG, qui est contenue dans l'élément de réponse HRE. Nous avons voulu nous assurer de son efficacité et de sa spécificité par rapport à HIF-1. Dans la littérature, cette molécule était décrite comme très efficace vis-à-vis de HIF-1 et assez spécifique, n'étant censée interférer qu'avec quelques facteurs à motif bHLH (comme c-myc) et ce, dans une moindre mesure qu'avec HIF1. Les résultats de nos expériences ont montré que l'échinomycine est très efficace pour inhiber la liaison à l'ADN de HIF-1. Nous avons ensuite voulu voir si cette inhibition de liaison se répercutait sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 : deux approches expérimentales différentes ont montré une grande efficacité de l'échinomycine à réduire l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Il faut cependant noter qu'au cours de nos expériences, il nous est apparu que l'échinomycine augmentait la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 ainsi que l'abondance protéique de HIF-1 α en normoxie à la concentration de 2 nM. Cette observation avait déjà été discutée précédemment et ne sera donc pas détaillée davantage ici.

Nous avons tout de même testé la spécificité de l'échinomycine vis-à-vis d'un autre facteur à motif bHLH (c-myc), mais aussi vis-à-vis d'un facteur ne possédant pas ce motif (AP1, que l'échinomycine n'est pas censée inhiber). Comme pour HIF1, nous avons effectué des tests de liaison à l'ADN et des mesures d'activité transcriptionnelle pour ces deux facteurs. Ils

nous ont révélé que l' échinomycine inhibait significativement l' activité de liaison à l' ADN et l' activité transcriptionnelle de l' un comme de l' autre. L' échinomycine manque donc de spécificité et inhibe de manière assez importante d' autres facteurs à motif bHLH que HIF1, mais aussi des facteurs ne possédant pas ce motif. Pour toutes ces raisons, et d' autres détaillées dans la rubrique consacrée à l' échinomycine, nous avons jugé que pour le type d' études que nous allions effectuer, il serait plus judicieux d' opter pour un système plus spécifique.

Nous nous sommes donc orientés vers la seconde approche, celles des si-RNA anti HIF-1 α de chez Dharmacon. Utilisés avec un agent de transfection spécialement conçu pour transfecter des si-RNA, ils étaient annoncés comme à même de pouvoir inhiber l' expression de la protéine à près de 95 %. Comme pour l' échinomycine, nous avons effectué des expériences préliminaires destinées à s' assurer de leur efficacité ainsi qu' à trouver les concentrations et temps post-transfection les plus appropriés pour obtenir une dégradation optimale du messenger de HIF-1 α . Le suivi de l'abondance protéique de HIF-1 α par immunofluorescence en utilisant des concentrations de si-RNA s' étalant de 10 à 100 nM pour deux délais post transfection (24 et 48 heures), nous a appris que les si-RNA étaient extrêmement efficaces. Dès la concentration de 10 nM, ils engendrent une diminution d' abondance de HIF-1 α de plus de 90%. Les résultats obtenus 24 heures après le début de la transfection semblaient optimaux. Ces résultats ont été confirmés en estimant l' abondance de HIF-1 α par western blot. Ces expériences ont montré que la concentration de 20 nM était optimale et comme les concentrations supérieures à 20 nM ne semblaient pas avoir un effet plus marqué, nous avons décidé d' utiliser cette concentration pour les expériences ultérieures. Nous avons ensuite étudié les répercussions de cette importante diminution d' expression de la sous unité HIF-1 α sur l' activité transcriptionnelle de HIF-1. Pour ce faire, nous avons utilisé un système rapporteur. Malheureusement, aucune inhibition de l' activité de HIF-1 n' a été observée. Après avoir vérifié différents paramètres expérimentaux, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer ces observations inattendues :

- 1) les deux transfections perturbent les cellules qui ne répondent alors plus normalement, par exemple parce que les deux agents transfectant interfèrent entre eux ou perturbent de manière trop importante la physiologie de la cellule.
- 2) HIF-2 α pourrait compenser l'activité inhibée de HIF-1 α , cela avait déjà été observé par Raval *et al.* (2005) sur des cellules de carcinome rénal.

Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de vérifier ces hypothèses ainsi que pour montrer que l' inhibition de l' expression de HIF-1 α induit bien une diminution de l' activité de HIF-1. L' inhibition de la surexpression de BNIP3 en hypoxie dans les cellules transfectées avec les si-RNA observée sur le microdamier, tend cependant à montrer que c' est effectivement bien le cas.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié l' effet de l' inhibition de HIF-1, en utilisant les si-RNA anti HIF-1 α , sur l'apoptose et les changements d'expression génique induits par l' étoposide.

Nous avons incubé sous hypoxie en présence d' étoposide (50 μ M) des cellules transfectées avec les si-RNA anti HIF-1 α , des si-RNA contrôle négatif et des cellules non transfectées. Nous avons ensuite comparé leur réponse au stress pro-apoptotique que constitue l' étoposide. Pour étudier la réponse des cellules, nous avons utilisé deux approches.

Nous avons d' une part réalisé un western révélant le fragment de 85 kDa de PARP et d' autre part mesuré l' activité de la caspase 3. Les résultats du western montrent une abondance élevée de PARP clivé dans des cellules incubées en présence d' étoposide en normoxie. Par contre, pour les mêmes conditions en hypoxie, l' abondance du fragment de 85 kDa est bien moindre, illustrant ainsi la protection apportée par l' hypoxie. Les cellules transfectées avec les

si-RNA et incubées sous hypoxie en présence d' étoposide, montrent une abondance du fragment de 85 kDa supérieure à celle des cellules non transfectées incubées dans les mêmes conditions. Cela signifie que l' incapacitation de HIF-1 lève la protection apportée par l' hypoxie. Les cellules transfectées avec le non targeting RNA et l' agent transfectant seul montrent également une abondance accrue du fragment de 85 kDa de PARP mais dans une bien moindre mesure que lors de la transfection avec les si-RNA spécifiques. Cela est probablement dû au fait que la transfection constitue un stress supplémentaire pour les cellules. Les résultats obtenus lors de la mesure de l' activité caspase 3 donnent des résultats comparables, on observe une protection des cellules incubées en hypoxie en présence d' étoposide par rapport à celles incubées en normoxie en présence d' étoposide. L' hypoxie protège donc bien. De plus, cette protection est levée pour les cellules transfectées avec des si-RNA, cela se traduit par une activité caspase 3 accrue. Comme pour l' expérience précédente, l' agent transfectant et le non targeting RNA semblent stresser légèrement les cellules. Les résultats de ces deux expériences confirment que l' hypoxie protège bien de l' apoptose induite par l' étoposide, mais ils mettent de plus en évidence le fait que le facteur de transcription HIF-1 est, au moins en partie, responsable de cet effet.

Dans le but d' en savoir plus sur les différents acteurs impliqués dans cette protection, nous avons ensuite utilisé des micro damiers à ADN permettant de révéler le profil de transcription de 123 gènes impliqués dans le processus d' apoptose. Nous avons remarqué que l' abondance du messenger de la protéine pro-apoptotique Bak était fortement accrue dans les cellules incubées en normoxie en présence d' étoposide. Par contre, il n' est plus détecté dans les cellules incubées sous hypoxie en présence ou absence d' étoposide. Son messenger est de nouveau détecté de manière importante dans les cellules transfectées avec les si-RNA et incubées sous hypoxie en présence d' étoposide. Cela signifie qu' en normoxie, les dommages induits par l' étoposide provoquent l' expression de Bak par l' activation de p53 et que l' hypoxie prévient cette induction. Ce système de répression de l' expression de Bak ne serait plus (ou du moins plus autant) effectif dans les cellules transfectées avec les si-RNA anti HIF-1 α et incubées sous hypoxie en présence d' étoposide car le messenger de Bak est de nouveau présent en quantité dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que le système de répression de la transcription de Bak dépend de HIF-1. Il pourrait être le fruit de son activité transcriptionnelle ou d' interactions protéine-protéine. Nous émettons donc l' hypothèse que la protection apportée par l' hypoxie contre l' apoptose serait, au moins en partie, due à une répression par HIF-1 de la transcription de Bak induite par l' étoposide. L' hypoxie avait déjà été décrite comme anti-apoptotique dans la littérature (Zaman *et al.*, 1999) et certains ont même mis en évidence une répression transcriptionnelle de Bax et Bid dépendante de HIF-1 dans les cellules de cancer de côlon (Erler *et al.*, 2004). Cependant, rien n' a été décrit par rapport à Bak, et dans l' étude d' Erler *et al.* (2004), Bak est même décrit comme n' étant pas influencé par l' hypoxie dans ce modèle expérimental. Il faut noter que nous n' avons rien observé d' intéressant sur le damier par rapport à Bax alors que l' ARNm de Bid n' a pas été détecté.

Dans la suite du travail, les observations obtenues sur micro damier devraient être confirmées par une série de damiers réalisés en triple. Il faudrait aussi confirmer les variations de l' abondance de Bak au niveau protéique. Il serait ensuite intéressant d' étudier le rôle de Bak dans l' induction de l' apoptose par l' étoposide et de voir si sa seule inhibition, par exemple à l' aide de siRNA, pourrait prévenir cette apoptose. On pourrait aussi comparer la levée de la protection dans les cellules transfectées avec des si-RNA anti HIF-1 α incubées sous hypoxie en présence d' étoposide avec des cellules incubées dans les mêmes conditions mais transfectées avec des si-RNA anti HIF-1 α et anti Bak. Si la protection de l' apoptose observée en hypoxie est due à la répression de la transcription de Bak par un phénomène dépendant de HIF-1, et que la levée de la protection est due à un accroissement de l' abondance de son

transcrit, les cellules transfectées avec des si-RNA anti HIF-1 α et anti Bak ne devraient pas « perdre la protection » et devraient donc être résistantes.

Dans un dernier temps, nous voudrions comprendre comment le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s), HIF-1 réprime l' expression de l' ARNm de Bak.

Le promoteur du gène BAK 1 contient 7 sites HRE potentiels, ainsi que 2 sites potentiels de liaison pour p53 (A. Sermeus, mémoire de licence). Il a déjà été montré que HIF-1 était responsable d' une répression de la transcription de Bid en hypoxie (Erler *et al.*, 2004). De plus, un élément HRE capable de lier efficacement HIF-1 a été identifié dans le promoteur de ce dernier, suggérant fortement que HIF-1 effectue son activité en agissant directement en tant que répresseur transcriptionnel. Il est dès lors fort possible qu' un mécanisme similaire puisse être responsable de la diminution d' abondance du messager de Bak. Une analyse expérimentale de son promoteur dans un système rapporteur permettrait de vérifier si ces sites potentiels sont fonctionnels *in vivo* et si HIF-1 réprime son activité lorsqu' elle est induite par l' étoposide.

En conclusion, nous avons confirmé que l' hypoxie protège les cellules HepG2 de l' apoptose induite par l' étoposide. L' ensemble des résultats suggère que le facteur de transcription HIF1 pourrait jouer un rôle important dans la régulation de certains gènes impliqués dans le processus d' apoptose pour les conditions étudiées, même s' il est probable que d' autres facteurs interviennent. La modulation de l' expression du gène Bak est à cet égard très intéressante.

Bien qu' il soit connu que l' hypoxie régnant au sein des tumeurs diminue l' efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie, les mécanismes étant à l' origine de ces phénomènes sont toujours à l' heure actuelle nébuleux. Les résultats obtenus durant ce mémoire montrent que si l' hypoxie et HIF1 protègent effectivement les cellules cancéreuses de l' apoptose induite par la chimiothérapie, les effets qu' elles engendrent au niveau des modifications d' expression génique sont complexes. Ces études sont cependant intéressantes pour pouvoir à long terme ouvrir la voie à des thérapies nouvelles et plus efficaces contre le cancer.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams, J. M. Ways of dying : multiple pathways to apoptosis. *Genes and development* **17**, 2481-95 (2003).
- Berra, E. et al. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Review* **19**, 139-45 (2000).
- Bilton, R. & Booker G. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation. *Eur J Biochemistry* **270**, 791-8 (2003).
- Bras, M. et al. Programmed cell death via mitochondria : different modes of dying. *Biochemistry* **2**, 231-9 (2005).
- Brown, J. M. & Wilson, W. R. Exploiting Tumour Hypoxia in Cancer Treatment. *Nature Reviews* **4**, 437-47 (2004).
- Bruick, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by Hypoxia. *Procl Nat Acad Sc* **16**, 9082-87 (2000).
- Bruick, R. K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway : regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes and Development* **17**, 2614-23 (2003).
- Bruick, R. K. & McKnight SL. Building better vasculature. *Genes and Development* **15**, 2497-502 (2001).
- Burlacu, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Med* **3**, 249-57 (2003).
- Byrne, A. M. et al. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med* **4**, 777-94 (2005).
- Carmeliet, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485-490 (1998).
- Chau, N. M. et al. Identification of novel small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 that differentially block hypoxia-inducible factor-1 activity and hypoxia-inducible factor-1 α induction in response to hypoxic stress and growth factors. *Cancer Research* **65**, 4918-28 (2005).
- Chaudhary, P. M. et al. Death Receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* **7**, 821-30 (1997).
- Chen, D. et al. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biological Chemistry* **278**, 13595-8 (2003).
- Chilov, D. et al. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) : heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J Cell Sci* **112**, 1203-12 (1999).
- Chun, YS. et al. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α . *J Korean Med Sci* **17**, 581-8 (2002).
- Erler, J. T. et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* **7**, 2875-89 (2004).
- Fan, TJ. et al. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys* **37**, 719-27 (2005).
- Farrell, F. & Lee, A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* **9**, 18-30 (2004).
- Feldser, D. et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Research* **59**, 15-8 (1999).
- Ferraro, E. et al. Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J. Cell. Mol Med* **1**, 21-34 (2003).
- Ferri K. F. & Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature cell biology* **3**, 255-63 (2001).

- Fuentes Prior P. & Salvesen G. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**, 201-32 (2004).
- Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis ? *Nature Reviews* **4**, 891-9 (2004).
- Gewies, A. Introduction to apoptosis. *ApoReview* 1-26 (2003).
- Gleadle, J. M. & Ratcliffe, P. J. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia : evidence against a regulatory role for Src kinase. *Blood* **89**, 503-9 (1997).
- Giaccia, A. et al. HIF-1 as a target for drug development. *Nature Reviews* **2**, 1-9 (2003).
- Greijer, AE et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *Journal of Pathology* **206**, 291-304 (2005).
- Guo, K. et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell death and Differentiation* **8**, 367-76 (2001).
- Harris, AL. von Hippel-Lindau syndrome : target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* **5**, 32-6 (2000).
- Haupt, S. et al. Apoptosis – The p53 network. *Journal of cell science* **116**, 4077-85 (2003).
- Heidi, M. HIF-1 dependent Regulation of Hypoxic Induction of the Cell Death Factors BNIP3 and NIX in Human Tumors. *Cancer Research* **61**, 6669-73 (2001).
- Hill et al. Portrait of a killer : the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* **3**, 19-26 (2003).
- Höpfl, G. et al. HIFs tumors : causes and consequences. *American journal of Physiology* **286**, 608-623 (2004).
- Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death : tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews* **2**, 1-11 (2002).
- Ivan, M. et al. HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation : implications for O₂ Sensing. *Science* **292**, 464-468 (2001).
- Josko, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* **6**, 1047-52 (2000).
- Kallio, P. J. et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **274**, 6519-25 (1999).
- Kallio, P. J. et al. Signal transduction in hypoxic cells : inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p200 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* **17**, 6573-86 (1998).
- Kelekar, A. & Thompson CB. Bcl-2 family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**, 324-30 (1998).
- Kerr, J.F. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
- Khosravi, R. et al. Rapid ATM' dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 14973-7 (1999).
- Kim, K. S., Multifunctional role of Fas-associated death domain protein in apoptosis. *Journal of biochemistry and molecular biology* **1**, 1-6 (2001).
- Kong, D. et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Research* **65**, 9047-55 (2005).
- Krishnamachary, B. et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Research* **63**, 1138-43 (2003).
- Kung, A. L. et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer cell* **6**, 33-43 (2004).
- Lavrik, I. N. et al. Caspases : pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation* **11**, 2665-72 (2005).
- Lee, J. W. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological

- functions. *Experimental and Molecular Medicine* **1**, 1-12 (2004).
- Lee, N. K. & Lee, S. Y. Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **1**, 61-66 (2002).
- Liping, L. & Celeste, S. Regulation of Transcription and Translation by Hypoxia. *Cancer Biology and Therapy* **3-6**, 492-7 (2004).
- Lu, H. et al. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **277**, 23111-5 (2002).
- Mc Manus, M. T. & Sharp, P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNA' s. *Nature Reviews* **3**, 737-47 (2002).
- Martins, L. M. et al. Binding Specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* **278**, 49417-27 (2003).
- Maya, R. et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395 : role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* **15**, 1067-77 (2001).
- Medema, JP. et al. Flice is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* **16**, 2794-804 (1997).
- Michels, J. et al. Molecules in focus : Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 267-71 (2005).
- Michiels, C. Physiological and pathological Responses to Hypoxia. *American journal of pathology* **164**, 1875-82 (2004).
- Minchenko, O.H. et al. Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim Pol* **52**, 881-8 (2005).
- Minet, E. et al. HIF-1 α gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and *cis* elements located within the 5' UTR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**, 534-40 (1999).
- Minet, E. et al. Accumulation of the pro-apoptotic factor Bak is controlled by antagonist factor Mcl-1 availability. *Apoptosis* **11**, 1039-47 (2006).
- Nagaki, T. et al. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* **268**, 297-305 (1992).
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-65 (1997).
- Neufeld, G. et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *FASEB J* **13**, 9-22 (1999).
- Park, J. W. et al. Hypoxia-inducible factor 1-related diseases and prospective therapeutic tools. *Journal of Pharmacological Sciences* **94**, 221-32 (2004).
- Park, J. Y. et al. Molecular signaling cascade in DNA bisintercalator, echinomycin-induced apoptosis of HT-29 cells evidence of the apoptotic process via activation of the *cytochrome c*-ERK-caspase-3 pathway. *The journal of biochemistry and cell biology* **38**, 244-54 (2006).
- Peter, ME. & Krammer, PH. The CD/95 (APO-1/Fas) DISC and beyon. *Cell Death and differentiation* **10**, 26-35 (2003).
- Philchenkov, A. Caspases : potential targets for regulating cell death. *Apoptosis Review Series* **4**, 432-44 (2004).
- Piret, J. P. et al. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Overexpression of Myeloid Cell Factor-1 protects Hypoxic Cells against *tert*-Butyl Hydroperoxide-induced Apoptosis. *The journal of biological chemistry* **10**, 9336-44 (2005).
- Piret, J. P. et al. Is HIF-1 α a pro- or anti-apoptotic protein ? *Biochemical Pharmacology* **64**, 889-892 (2002).
- Piret, J. P. et al. Hypoxia-inducible factor-1 dependent overexpression of myeloid cell factor-

- 1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *Journal of biological chemistry* **280**, 9336-44 (2004).
- Pugh, C. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia : role of the HIF system. *Nature Medicine* **6**, 677-84 (2003).
- Raghunand, N. et al. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *The british Journal of Radiology* **76**, 11-22 (2003).
- Rapisarda, A. et al. Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor- α protein accumulation. Angiogenesis, and tumor growth by Topotecan in U251-HRE Glioblastoma Xenografts. *Cancer Research* **64**, 6845-48 (2004).
- Rapisarda, A. et al. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1 : mechanism and therapeutic implications. *Cancer Research* **64**, 1475-82 (2004).
- Riedl, S. J. & Shi, Y. Molecular mechanisms of caspase Regulation during Apoptosis. *Nature Reviews* **5**, 897-907 (2004).
- Rotonda, J. et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* **3**, 619-25 (1996).
- Ruas, J. L. & Poellinger, L. Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **5**, 1-9, 2005.
- Rzychon, M. et al. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochimica Polonica* **4**, 861-73 (2004).
- Salvesen, GS. & Dixit Vm. Caspase activation : the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 10964-7 (1999).
- Schlappack, OK. et al. Glucose starvation and acidosis : effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *Br J Cancer* **64**, 663-70 (1991).
- Schmid T. et al. HIF-1 and p53 : communication of transcription factors under hypoxia. *J. Cell Mol Med* **8**, 423-31 (2004).
- Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 : control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res* **49**, 614-7 (2001).
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews* **3**, 1-12 (2003).
- Shi, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation : a mechanistic view. *Protein Sci* **13**, 1979-87 (2004).
- Shi, Y. & Fang, W. Hypoxia-inducible factor-1 tumour angiogenesis. *World J. Gastroenterol* **10**, 1082-87 (2004).
- Shishodia, S. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor- κ B activation : a question of life or death. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **1**, 28-40 (2002).
- Sowter, H. M. et al. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (HIF) 1 α versus Hif-2 α regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Research* **63**, 6130-4 (2003).
- Tartaglia, . et al. Ligand passing : the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18542-8 (1993).
- Thornberry, NA. & Lazebnik, Y. Caspases : enemies within. *Science* **281**, 1312-6 (1998).
- van Loo, G. et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis : a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differentiation* **9**, 1031-42 (2002).
- Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* **9**, 10-7 (2004).
- Wang, et al. Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Pro Natl Acad Sci* **92**, 5510-4 (1995).
- Wenger R. H. Cellular adaptation to hypoxia : O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal*

- 16**, 1151-7 (2002).
- Wilson, K. P. et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-5(1994).
- Wyllie, AH. Apoptosis : cell death in tissue regulation. *J Pathol* **153**, 313-6 (1987).
- Yeo, E. J. et al. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochemical Pharmacology* **68**, 1061-69 (2004).
- Yang, J. et al. ATM and ART : Sensing DNA damage. *World journal of Gastroenterology* **10**, 155-160 (2004).
- Zagórska, A. & Dulak J. HIF-1 : the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica* **3**, 563-585 (2004).
- Zaman, et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21 (waf1/cip1) and erythropoietin. *J. Neurosci* **19**, 9821-9830 (1999).

Annexes

Annexe : Liste des gènes détectables à l' aide de la DualChipTM Human Apoptosis

Gene Symbol	Gene Name	Official Gene Symbol	General Function	Specific Function
ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	ABL1	Cell cycle	ATP binding; kinase activity
ADAM 17	a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	ADAM 17	Cell migration	Metalloendopeptidase activity
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	AKT2	Apoptosis	Protein amino acid phosphorylation
BAD	BCL2-antagonist of cell death	BAD	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAG	BCL2-associated athanogene	BAG1	Apoptosis	Interacts with Bcl2
BAK 1	BCL2-antagonist/killer 1	BAK 1	Apoptosis	Accelerates programmed cell death by binding to BCL-2
bax	BCL2-associated X protein	BAX	Apoptosis	Induces the release of cyt C, activation of caspase-3
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	Apoptosis	Regulates the death cell
BCL2A1	BCL2-related protein A1	BCL2A1	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BclX	BCLX protein	BclX	Apoptosis	Induces or Inhibits apoptosis according to the alternative form
BID	BH3 interacting domain death agonist	BID	Apoptosis	Apoptotic mitochondrial changes; Death receptor ligand
23kd	23KDa Highly basic protein	RPL13A	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BIK	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	BIRC2	Apoptosis	Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Aldo	Aldolase A,	ALDOA	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	Apoptosis	Interacts with TNF receptor associated factors 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2)
BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4	BIRC4	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	Apoptosis	Cysteine protease inhibitor activity
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	Apoptosis	Binds to the adenovirus E1B 19 kDa protein or to BCL-2
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	Apoptosis	Caspase activity
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed)	CASP2	Apoptosis	Activated in cytotoxic stress,required for the permeabilization of mitochondria,required for stress-induced apoptosis
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	Apoptosis	Initiation of apoptotic cell death; PARP cleavage protease
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	Protein binding	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	Apoptosis	Thiol protease; PARP cleavage protease=signature apoptotic fragments
cnd1	cyclinD1	CCND1	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6

cnd2	cyclinD2	CCND2	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
Tubu	Alpha-tubulin	K-ALPHA-1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
CCNH	cyclin H	CCNH	Cell cycle	Phosphosrylates and activates cyclin-dependant protein kinases in the regulation of cell cycle progression
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDC25C	cell division cycle 25C	CDC25C	Cell cycle	Dephosphorylates CDC2 and
CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	Cell cycle	Negative regulation of DNA replication
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	CDK2	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CMM3	cyclin-dependent kinase 4	CDK4	Cell cycle	The activity of this kinase is restricted to the G1-S phase; cell proliferation
CDK5	cyclin-dependent kinase 5	CDK5	Cell cycle	Interacts with p35 which
p35	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	CDK5R1	Cell cycle	Activates the kinase
cdk6	cyclin-dependent kinase 6	CDK6	Cell cycle	Interacts with D-type cyclins and phosphorylate pRB in G1-phase
ACTB	Beta-Actin	ACTB	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
cdk7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	CDK7	Cell cycle	Regulation of cyclin dependent protein kinase activity
cdk9	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	CDK9	Cell proliferation	Regulation of cell cycle
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	Cell cycle	Inhibitor 1A of G1-specific CDK-cyclin complexes
p57	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	Cell cycle	Inhibits G1-specific CDK-cyclin complexes,negative regulator of cell proliferation.
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	CDKN2A	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 2A, tumor suppressor gene
p14-15	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	CDKN2B	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	Apoptosis	Caspase activity
CLK1	CDC-like kinase 1	CLK1	Cell cycle	Protein serine/threonine kinase activity
APOJ	ApolipoproteinJ	CLU	Lipid metabolism	Activate its kinase activity
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	Cell proliferation	Intracellular protein transport
cyc	Cyclophilin 33A	PPIE	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
REDD2	DDIT4L: DNA-damage-inducible transcript 4-like	DDIT4L	/	/
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	DFFA	Apoptosis	DNA fragmentation
E2F1	E2F transcription factor 1	E2F1	Transcription	Tumor suppressor, Transcription factor
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	GAPD	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
E2F3	E2F transcription factor 3	E2F3	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein

E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	E2F5	Transcription	Transcription factor, DNA binding
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD	Apoptosis	Active caspase-8 initiates the subsequent cascades of caspase mediating apoptosis
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	Stress response	Glutathione transferase activity
GAS1	growth arrest-specific 1	GAS1	DNA repair	Structural constituent of ribosome
GPX	glutathione peroxidase 1	GPX1	Oxidative metabolism	Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	GRB2	Cell cycle	Cell structure
GSA	glutathione S-transferase A1	GSA	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSM	glutathione S-transferase M1	GSM	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSR	glutathione reductase	GSR	Drug metabolism	Glutathion : Maintain high levels of reduced glutathione (phase II)
GSTPi	Glutathione S-transferase pi	GSTP1	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSTT1	Glutathione S-transferase theta1	GSTT1	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	Growth factor and cytokines	Muscle/skeletal development; Growth factor
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	Cell signaling / receptor	Anti-apoptotic; receptor
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	IGF2	Skeletal development	Regulation of cell cycle; potent mitogens for cultured cells
IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	Receptor	Binds insulin growth factor II
IGF2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
HK1	Hexokinase 1	HK1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	Cell proliferation	Regulation of cell growth
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	IGFBP6	Signal transduction	Signal transduction
ING1	inhibitor of growth family, member 1	ING	Cell proliferation	Tumor suppressor; potent growth regulator in normal and in established cells
JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	MAPK signaling pathway	RNA polymerase II transcription factor activity
TNFB	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LTA	Growth factor and cytokines	induction of apoptosis
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	Growth factor and cytokines	Role in immune response
MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1	Cell cycle	Kinase; Catalyzes the phosphorylation of a thr and a tyr in a thr-glu-tyr

MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAP2K6	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	MAP3K14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
erk2	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Apoptosis	Transferase activity
JNK3	mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	Stress response	Kinase
MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	MAPK12	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MDH	Malate dehydrogenase 1	MDH1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
erk1	mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
erk5	mitogen-activated protein kinase 7	MAPK7	Cell adhesion	Protein-tyrosine kinase activity
JNK1	mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
JNK2	mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
PLA2	Phospholipase A2	YWHAZ	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	MDM2	Oncogenesis	Transcription factor
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	Glutathione metabolism	Transferase activity
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	MYCN	Transcription factor	Transcription factor activity
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	Wnt signaling pathway	Regulate the activation, proliferation, differentiation and programmed death of T-lymphocytes
NFKB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB1	Transcription	Inflammatory response; antibacterial humoral response
NOS2A	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	NOS2A	Electron transport	Nitric-oxide synthase activity
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility
PDE1B	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	PDE1B	Apoptosis	Calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
S9	Ribosomal Proteine S9	RPS9	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
PLD1	phospholipase D1, phophatidylcholine-specific	PLD1	Phospholipid metabolism	Phospholipase D activity
PLK	polo-like kinase (Drosophila)	PLK	DNA repair / synthesis	Mitosis, kinase
POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase	POR	Electron transport	Oxidoreductase activity
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	Oncogenesis	Apoptosis regulation, Kinase
RARB	retinoic acid receptor, beta	RARB	Receptor activity	Receptor of retinoic acid
RB1	retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	RB1	Cell cycle	Interacts with histone deacetylase to repress transcription; tumor repressor

RB2	retinoblastoma-like 2 (p130)	RBL2	Cell cycle	Negative regulation of cell cycle
RBP1	retinoblastoma binding protein 1	RBP1	DNA binding / cell cycle	Chromatin binding
RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIPK1	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	Signal transduction	Protein binding
DP1	transcription factor Dp-1	TFDP1	Transcription	Mediator of transcriptional activation by TGF-beta receptor;involved in the cell cycle ; Pol II transcription
DP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	TFDP2	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
SDS	Serine Dehydratase	SDS	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
TNFa	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF	Apoptosis	Endotoxin; pathophysiology of sepsis
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TNFRSF10A	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1A	Growth factor and cytokine	Receptor activity
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	TNFRSF1B	Cell signaling / receptor	Receptor
TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	Growth factor and cytokine	Transmembrane receptor activity
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF5	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)	TNFSF5	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF6	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	TNFSF6	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
TFR	Transferrin receptor	TFRC	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	TNFSF7	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
p53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	TP53	Cell cycle	DNA-binding protein; tumor suppressor activity
TP73	tumor protein p73	TP73	Transcription factor	Transcription factor activity
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	TRADD	Apoptosis	induction of apoptosis
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	TRAF2	Signal transduction	Signal transducer activity
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	Apoptosis	Role in immune response
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	Apoptosis	Signal transducer activity
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	TRAF6	MAPK signaling pathway	Mediates activation of NF-kappa-B and JNK

